

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO SÍTIO
CIRÚRGICO DE CÃES, MÃOS DO CIRURGIÃO E AMBIENTE
DA SALA OPERATÓRIA**

Mareliza Possa de Menezes

Médica Veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO SÍTIO
CIRÚRGICO DE CÃES, MÃOS DO CIRURGIÃO E AMBIENTE
DA SALA OPERATÓRIA**

Mareliza Possa de Menezes

Orientadora: **Profa. Dra. Paola Castro Moraes**

Coorientadora: **Profa. Dra. Marita Vedovelli Cardozo**

Tese apresentada à banca examinadora da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
– UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor em Cirurgia Veterinária.

M543d

Menezes, Mareliza Possa de

Diversidade genética e resistência aos antimicrobianos de bactérias isoladas do sítio cirúrgico de cães, mãos do cirurgião e ambiente da sala operatória / Mareliza Possa de Menezes. -- Jaboticabal, 2025
81 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Paola Castro Moraes

Coorientadora: Marita Vedovelli Cardozo

1. Medicina veterinária. 2. Cirurgia veterinária. 3. Bacteriologia veterinária. 4. Farmacorresistência bacteriana. I. Título.

REGISTRO DE IMPACTO

Este estudo impacta a sociedade ao evidenciar a disseminação de bactérias multirresistentes em hospitais veterinários, alertando para riscos à saúde animal e humana. Os achados reforçam a necessidade de políticas rigorosas de controle de infecção, promovendo segurança em procedimentos cirúrgicos e conscientização sobre o uso racional de antimicrobianos na medicina veterinária.

This study impacts society by highlighting the spread of multidrug-resistant bacteria in veterinary hospitals, raising awareness of risks to both animal and human health. The findings reinforce the need for strict infection control policies, promoting safety in surgical procedures and awareness of the rational use of antimicrobials in veterinary medicine.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DIVERSIDADE GENÉTICA E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO SÍTIO CIRÚRGICO DE CÃES, MÃOS DO CIRURGIÃO E AMBIENTE DA SALA OPERATÓRIA

AUTORA: MARELIZA POSSA DE MENEZES

ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES

COORIENTADORA: MARITA VEDOVELLI CARDOZO

COORIENTADORA: MILENA TAVARES LIMA CONSTANCIO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Cirurgia Veterinária, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES (Participação Presencial)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
gov.br PAOLA CASTRO MORAES
Data: 20/02/2025 13:50:49-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. LUCAS JOSÉ LUDUVÉRIO PIZAURIO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Agrárias Ambientais / Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) - Ilhéus/BA

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCAS JOSÉ LUDUVÉRIO PIZAURIO
Data: 20/02/2025 17:23:05-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. MARCIO GARCIA RIBEIRO (Participação Virtual)
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública / FMVZ UNESP Botucatu

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCIO GARCIA RIBEIRO
Data: 24/02/2025 08:42:51-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. FERNANDO YOITI KITAMURA KAWAMOTO (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária / Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS) - Lavras/MG

Documento assinado digitalmente
gov.br FERNANDO YOITI KITAMURA KAWAMOTO
Data: 20/02/2025 14:35:16-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



Profa. Dra. ANNELEISE CARLA CAMPRESI DOS SANTOS (Participação Presencial)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal



Documento assinado digitalmente

ANNELEISE CARLA CAMPRESI DOS SANTOS
Data: 21/02/2025 14:56:18 0300
Verifique em <https://validar.id.gov.br>

Jaboticabal, 19 de fevereiro de 2025

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Mareliza Possa de Menezes, natural de Barretos – SP, nascida no dia 28 de dezembro de 1990. Formada em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP Câmpus de Jaboticabal, graduação realizada entre 2010 – 2015. Realizou residência médica pelo Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária e Saúde Pública com área de concentração em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP Câmpus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Paola Castro Moraes. Recebeu título de mestre em Cirurgia Veterinária pelo programa de pós-graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP Câmpus de Jaboticabal. Realizou estágio de pesquisa no exterior – bolsa BEPE FAPESP, em 2022, juntamente ao grupo de pesquisa “*One Health Antimicrobial Resistance Group*” da Universidade de Copenhague, Dinamarca. É vice-presidente do Núcleo de Apoio à População Ribeirinha da Amazônia (NAPRA), no qual vem desenvolvendo atividades multidisciplinares em comunidades na região do Baixo Madeira (Porto Velho-RO) nos últimos 4 anos. Atualmente é aluna do curso de Doutorado do mesmo programa de pós-graduação, com orientação da Profa. Dra. Paola Castro Moraes. Atua junto ao Serviço de Cirurgia Geral e Endoscopia Veterinária (CIGEV), coordenado pela Profa. Dra. Paola Castro Moraes, desde 2018, e é integrante do grupo de pesquisa em Biotecnologia e Resistência Bacteriana (BioBac), sob coordenação da Profa. Dra. Marita Vedovelli Cardozo, ambos na FCAV/UNESP.

“É assim que venho tentando ser professor, assumindo minhas convicções, disponível ao saber, sensível à boniteza da prática educativa, instigado por seus desafios que não lhe permitem burocratizar-se, assumindo minhas limitações, acompanhadas sempre do esforço por superá-las, limitações que não procuro esconder em nome mesmo do respeito que me tenho e aos educandos.”

Pedagogia da Autonomia

Paulo Freire, 1996

AGRADECIMENTOS

Eu preferi não escrever os agradecimentos da forma tradicional e mecânica que geralmente os documentos oficiais exigem. Decidi tecer esse momento por um caminho diferente, puxando fios de memórias afetivas para me guiarem em um texto que faça ou não sentido. Pois, como alguém já me disse, a vida é um rio de histórias, e é navegando em histórias, nossas e dos outros, que vamos fluindo nisso que chamamos de vida. Espero que vocês gostem de navegar comigo nos minutos que se seguirão.

Eu fui uma criança curiosa, um tanto quanto incomodada com as injustiças e apaixonada por se aventurar. Cresci com os pés no chão ao mesmo tempo em que alçava voos altos na minha imaginação. E foi correndo e sentindo o vento tocar a minha pele enquanto ficava de pé na garupa da bicicleta azul do meu pai, que fui entendendo o que é liberdade.

Eu ainda não sabia bem como seria o futuro, e não me importava muito “o que eu seria quando crescesse”, porque eu já era ali um ser em si, de desejos, de sonhos, de opiniões. Cuidar de bicho e me dedicar à proteção ambiental sempre estiveram ali. mas quem diria que parte daquela criança curiosa chegaria a ser pesquisadora e educadora. E digo parte porque é mesmo um pequeno pedaço desse mosaico colorido que me constitui como ser. Um pequeno pedaço, mas não um todo, e essa multiplicidade que carrego desde criança é o que tem me salvado.

Hoje, finalmente, doutora. Mas preciso confessar que, o título em si não é o que me interessa mais. Uma ferramenta profissional importante, mas que diz muito pouco sobre mim. Me interessa o cotidiano e o que foi construído durante esse tempo. Tampouco a pessoa que ingressou na universidade em 2010 pensava que eu ia chegar aqui. Ter grande parte da minha vida sentada no computador lendo e escrevendo artigos e corrigindo trabalhos, definitivamente não estava nos meus planos.

E me pergunto então, como cheguei até aqui? Talvez tenha sido por ter deixado aflorar aquela curiosidade e inquietude da infância, talvez seja a paixão pela educação, talvez seja também pelo potencial que o espaço universitário pode me oferecer a desenvolver atividades diversas.

Provavelmente é tudo isso e mais um pouco, porém é também, sem sombras de dúvidas, pelas duas pessoas que aceitaram ao longo desses 7 anos de pesquisa, me guiar no centro cirúrgico, no laboratório ou na pesquisa.

Por normas burocráticas e institucionais, não dá para oficializar duas orientadoras, mas é isso que eu tive e gostaria de deixar claro aqui. Em algo basicamente como complementar, eu fui aprendendo e construindo uma relação de respeito e muito pouco hierárquica com as duas que se dispuseram a segurar minha mão ao longo desses anos. e segurar mesmo.

Frases como “Mareliza vai pra sua casa descansar” ou “vai passear com seus cachorros” ou “não aceita se você não quiser” eu ouvi quando necessário. Os acolhimentos aconteciam com frequência, ao mesmo tempo em que os chacoalhões vinham de uma forma muito responsável e cuidadosa, como: “Mareliza, preciso comentar sobre sua dissertação, quer vir aqui ou prefere que eu te ligue? tá confuso demais”. E assim fui aprendendo, com duas pessoas que nunca tiveram a necessidade de me diminuir, de me fazer sentir mal com meus erros, de me pressionar psicologicamente ou me desrespeitar. Criei um laço no qual me sinto confortável o suficiente para discordar, e para ouvir discordâncias. Afinal, as convergências nos fortalecem, mas as divergências nos expandem. E foi assim que construímos esse vínculo ao longo dos últimos anos.

Infelizmente, isso é raro. E muitas vezes malvisto dentro de um sistema exploratório e produtivista. Mas foi isso que me fez escolher chegar até aqui. E eu queria deixar isso registrado, Marita e Paola, para que vocês não se esqueçam de continuar se importando, de construir espaços de trabalho menos exaustivos e quebrar essa lógica de abusos, mesmo que minimamente e dentro das possibilidades que temos. Para que assim a gente queira estar nele, e que o respeito venha da admiração e não pelo medo ou imposição hierárquica. E admiração é a minha palavra para vocês duas. Vocês nunca fizeram questão de esconder suas limitações, e será isso que levarei comigo nas jornadas que se seguirão.

Para finalizar, seria um tanto quanto injusto nomear pessoas à que sou grata, pois são tantas. Porém, gostaria de enfatizar que a vida, pra mim, é coletiva. e não há possibilidade de um viver que não seja compartilhado. Assim, todas minhas ações mesmo que aconteçam no formato de um sistema individualista, sempre terão seu

viés coletivo. Dito isso, ter apenas um nome estampado na capa de uma tese não consegue dar conta de quantos atores precisaram estar ali, direta ou indiretamente, para que ela acontecesse.

Falo não só no sentido técnico e do trabalho, mas também no suporte emocional. Não existe vida que se sustente sem criação de vínculos, sem rede de apoio, sem aquilombamento. E para que eu chegasse aqui não foi diferente, são inúmeras pessoas e seres que me acompanharam, que me proporcionaram conexões e suporte quando mais precisei.

Aos meus amores da vida e aos meus queridos amigos de profissão, não dava pra ser sem vocês que fizeram parte de cada ciclo, conquistas e também das derrotas. aos que cresceram comigo ou aos que me encontraram nesse grande rio da vida que flui intensamente, há muito de vocês em todas minhas versões.

Nessa que tem nas mãos parte importante do seu trabalho de cuidado, na mente uma incessante sede de conhecimento, e na alma uma vontade avassaladora de sentir. Carrego na memória cada momento compartilhado, desde aquela criança curiosa ao redor da mesa enquanto a mãe dedicava tanto no alimento que produzia, quanto no cheiro de tinta do padrinho e da madrinha, ou as diversas reflexões com o tio na varanda de casa. O cheiro de incenso, os dias de diversão no clube, no video game, no quintal de casa. O desbravar das árvores da cidade. A intensidade da adolescência e a dureza e beleza da vida adulta. Os exaustivos, mas por vezes divertidos, dias de trabalho na bancada ou no hospital.

Há tanto de vocês em mim.

Parafraseando o mestre indígena Ailton Krenak, seguirei sendo como um peixe no rio, em movimento constante. Observando atentamente o seu fluxo para não exaurir contra a corrente, mas também não estar fixo diante do movimento da vida. como um peixe em um cardume, sendo eu e sendo nós.

Quero finalizar com um pensamento de mestre Nêgo Bispo “nós somos o começo, o meio e o começo” e o que seria esse meu final de ciclo se não, na verdade, só mais um começo.

Obrigada!

Adicionalmente, agradeço o apoio e financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado (nº 2019/20585-0), pela bolsa em estágio em pesquisa no exterior (BEPE: nº 2021/09438-5) e pelo financiamento desta pesquisa assim como agradeço todos os colaboradores que tivemos. Expressamos nossa gratidão à Prof^a. Dr^a. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, do Departamento de Biotecnologia Agrícola e Ambiental da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP), por disponibilizar o acesso ao software Bionumerics 7.1®.

SUMÁRIO

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	II
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 O fenômeno da resistência aos antimicrobianos na saúde coletiva multiespécie.....	2
2.2 Vigilância epidemiológica	4
2.3 Bactérias causadoras de infecções	7
2.3.1 <i>Staphylococcus</i> spp.	7
2.3.2 <i>Enterococcus</i> spp.....	8
2.3.3 <i>Escherichia coli</i>	10
2.4 Reservatórios de bactérias resistentes	10
2.5 Técnicas moleculares para caracterização bacteriana	11
2.5.1 MALDI-TOF	12
2.5.2 PCR.....	13
2.5.3 PFGE	13
3 HIPÓTESE	14
4 OBJETIVOS.....	14
4.1 OBJETIVO GERAL	14
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
5 MATERIAL E MÉTODOS	15
5.1 Aspectos Éticos	15
5.2 Desenho do estudo e população.....	15
5.3 Preparação do paciente e equipe cirúrgica	16
5.4 Amostragem	16
5.5 Identificação das espécies bacterianas.....	19
5.6 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	20
5.7 Detecção dos genes de resistência.....	21
5.7.1 Extração do DNA bacteriano.....	21
5.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	22
5.7.3 Genotipagem bacteriana.....	25
5.7.4 Análise de dados.....	26
6 RESULTADOS.....	26
6.1 Classificação das espécies bacterianas	26
6.2 Genes de resistência.....	31
6.3 Diversidade genética	38
7 DISCUSSÃO	41
8 CONCLUSÃO	46
9 REFERÊNCIAS	46

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



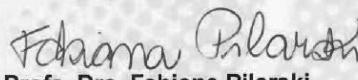
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Caracterização genética de microrganismos isolados no sítio cirúrgico de cães e ambiente cirúrgico**", protocolo nº 5436/20, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Paola Castro Moraes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 10 de dezembro de 2020.

Vigência do Projeto	01/02/2021 a 29/02/2024
Espécie / Linhagem	<i>Canis familiaris</i>
Nº de animais	30
Peso / Idade	Não determinado
Sexo	Fêmea ou macho
Origem	Pacientes atendidos no setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel"

Jaboticabal, 10 de dezembro de 2020.


Profa. Dra. Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNESP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS AGRÁRIAS E
VETERINÁRIAS E



Continuação do Parecer: 3.323.557

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1157291.pdf	03/05/2019 22:02:47		Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	02/05/2019 18:42:42	MARELIZA POSSA DE MENEZES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	02/05/2019 18:38:35	MARELIZA POSSA DE MENEZES	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_3224711.pdf	02/05/2019 16:40:33	MARELIZA POSSA DE MENEZES	Aceito
Parecer Anterior	Mareliza_PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CONEP_3274038.pdf	02/05/2019 16:40:00	MARELIZA POSSA DE MENEZES	Aceito
Orçamento	custos.pdf	02/05/2019 16:38:13	MARELIZA POSSA DE MENEZES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	02/05/2019 16:32:47	MARELIZA POSSA DE MENEZES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Decl_inst.JPG	18/03/2019 20:07:17	MARELIZA POSSA DE MENEZES	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_3172628.pdf	18/03/2019 18:01:15	MARELIZA POSSA DE MENEZES	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	18/03/2019 17:48:37	MARELIZA POSSA DE MENEZES	Aceito
Declaração do Patrocinador	responsab.pdf	24/01/2019 16:28:30	MARELIZA POSSA DE MENEZES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	pesquisadores.pdf	24/01/2019 16:28:06	MARELIZA POSSA DE MENEZES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	manuseio.pdf	24/01/2019 16:26:22	MARELIZA POSSA DE MENEZES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Via de Acesso Paulo Donato Castellane s/nº

Bairro: Vila Industrial

CEP: 14.884-900

UF: SP

Município: JABOTICABAL

Telefone: (16)3209-7168

E-mail: comiteetica@fcav.unesp.br

DIVERSIDADE GENÉTICA E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO SÍTIO CIRÚRGICO DE CÃES, MÃOS DO CIRURGIÃO E AMBIENTE DA SALA OPERATÓRIA

RESUMO – O objetivo deste estudo transversal prospectivo foi determinar a prevalência de genes de resistência e diversidade genética em isolados de *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., e *E. coli* isoladas no sítio cirúrgico superficial de cães, mãos dos cirurgiões e sala de operação durante o período intraoperatório. Trinta cães submetidos a cirurgias limpas/limpas-contaminadas (G1) e contaminadas (G2), juntamente com oito cirurgiões, foram incluídos no estudo. Amostras foram coletadas usando cotonete estéril, transportadas em solução de peptona bacteriológica 0,1% e semeadas em ágar sangue. Amostras ambientais foram coletadas através da exposição passiva utilizando-se placa de Petri com ágar BHI. Setenta e cinco isolados foram identificados utilizando MALDI-TOF MS. Genes de resistência foram detectados via PCR: *tet(M)*, *ermA*, *aacA-aphD*, *blaZ*, *mecA*, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV}, *bla*_{SHV-1}, *bla*_{CTX-M-1}, 3 e 15, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CMY-2}, *mcr*₁, *mcr*₂, *mcr*₃, *mcr*₄, e *ndm*. A diversidade genética foi avaliada com base no perfil em PFGE e o agrupamento realizado utilizando-se o método UPGMA. O teste qui-quadrado foi aplicado para comparar a frequência de detecção de genes de resistência bacteriana entre os isolados obtidos. *Staphylococcus pseudintermedius* (83,33% [20/24]), *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* (52,63% [10/19]) e *E. coli* (62,50% [5/8]) foram mais frequentemente isolados da pele dos cães, enquanto espécies de *Staphylococcus* spp. Coagulase-negativa (CoNS) (62,50% [15/24]) foram mais prevalentes no ambiente da sala de operação. Os genes de resistência *blaZ* (79,17%), *mecA* (43,75%), *tet(M)* (41,67%) e *aacA-aphD* (25%) foram detectados em *Staphylococcus* spp. Entre *Enterococcus* spp., *tet(M)* (78,95%) e *blaZ* (10,53%) foram identificados. Isolados de *S. pseudintermedius* exibiram maior proporção de portadores dos genes *tet(M)* e *aacA-aphD* em comparação com CoNS. Nenhum isolado de *E. coli* testou positivo para os genes investigados. Vinte e quatro padrões de bandas de PFGE foram observados em CoNS (24/24), 15 em *S. pseudintermedius* (15/24), 4 em *E. coli* (4/8) e 7 em *Enterococcus* spp. (7/19). Isolados geneticamente relacionados de *S. pseudintermedius* e *E. coli* foram obtidas da pele dos cães e do ambiente durante dois e um procedimento no G2, respectivamente. Sete *Enterococcus* spp. indistinguíveis foram identificados em diferentes procedimentos e animais distintos. O presente estudo revelou altas taxas de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina e *Enterococcus* spp. resistentes à tetraciclina colonizando o ambiente em hospital veterinário de ensino no Brasil. A análise de PFGE indicou alta diversidade de CoNS e *Enterococcus* spp. entre cães, veterinários e a sala de operação. Isolados geneticamente relacionadas foram encontradas em isolados de *S. pseudintermedius*, *Enterococcus* spp. e *E. coli*, enfatizando a necessidade de medidas eficazes de controle de infecção para minimizar a disseminação de bactérias multirresistentes. A vigilância passiva e ativa contínua é crucial para alcançar esse objetivo.

Palavras-chave: bactérias multirresistentes, *Enterococcus* spp. resistente à tetraciclina, infecção hospitalar, *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina, vigilância epidemiológica.

GENETIC DIVERSITY AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF BACTERIA ISOLATED FROM THE SURGICAL SITE OF DOGS, SURGEON'S HANDS, AND OPERATING ROOM ENVIRONMENT

ABSTRACT – This prospective cross-sectional study aimed to determine the occurrence of resistance genes and genetic diversity in *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., and *Escherichia coli* isolated from dogs' superficial surgical site (SS), surgeons' hands, and the operating room (OR) during the intraoperative period. Thirty dogs undergoing clean/clean-contaminated (G1, n=20) and contaminated surgeries (G2, n=10), along with eight surgeons, were included in the study. Specimens were collected using sterile swabs, transported in 0.1% bacteriological peptone solution, and spread onto blood agar. Environmental samples were collected through passive exposure using BHI agar plates. Seventy-five isolates were selected and classified using MALDI-TOF MS. Resistance genes were screened via PCR: *tet(M)*, *ermA*, *aacA-aphD*, *blaZ*, *mecA*, *bla_{TEM}-1*, *bla_{SHV}*, *bla_{SHV}-1*, *bla_{CTX-M}-1*, *bla_{CTX-M}-2*, *bla_{CMY}-2*, *mcr₁*, *mcr₂*, *mcr₃*, *mcr₄*, and *ndm*. Genetic diversity was assessed through PFGE analysis using *Sma*I and *Xba*I restriction enzymes, with clustering performed by the UPGMA method. The chi-square test compared the frequency of resistance gene detected. *Staphylococcus pseudintermedius* (83.33%), *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* (52.63%), and *E. coli* (62.50%) were more frequently isolated from dogs' skin, while coagulase-negative staphylococci (CoNS; 62.50%) were more frequent in the OR. Resistance genes detected in *Staphylococcus* spp. included *blaZ* (79.17%), *mecA* (43.75%), *tet(M)* (41.67%), and *aacA-aphD* (25%). Among *Enterococcus* spp., *tet(M)* (78.95%) and *blaZ* (10.53%) were identified. *S. pseudintermedius* harbored *tet(M)* and *aacA-aphD* genes more frequently than CoNS. No *E. coli* isolates tested positive for the investigated genes. Twenty-four PFGE banding patterns were observed in CoNS (24/24), 15 in *S. pseudintermedius* (15/24), 4 in *E. coli* (4/8), and 7 in *Enterococcus* spp. (7/19). Genetically related *S. pseudintermedius* and *E. coli* were obtained from SS and OR in G2. Seven indistinguishable *Enterococcus* spp. were identified across different procedures and patients. Our study revealed high rates of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. and tetracycline-resistant *Enterococcus* spp. colonizing the environment in a veterinary teaching hospital in Brazil. PFGE analysis indicated a high diversity of CoNS and *Enterococcus* spp. Genetically related strains in *S. pseudintermedius*, *Enterococcus* spp., and *E. coli* emphasize the importance of effective infection control policies to minimize the spread of resistant bacteria.

Keywords: epidemiological surveillance, hospital-acquired infection, methicillin-resistant *Staphylococcus* spp., multidrug-resistant bacteria, tetracycline-resistant *Enterococcus* spp.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de isolados de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp. e <i>Escherichia coli</i> obtidos do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.	19
Tabela 2. Genes de resistência amplificados por PCR em <i>Escherichia coli</i> isoladas do sítio cirúrgico de cães, das mãos de cirurgiões e da sala de operação em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil.	23
Tabela 4. Identificação por MALDI-TOF MS de espécies de <i>Staphylococcus</i> obtidas do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019. ...	27
Tabela 5. Identificação por MALDI-TOF MS de espécies de <i>Enterococcus</i> obtidas do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019. ...	28
Tabela 6. Identificação por MALDI-TOF MS de <i>Escherichia coli</i> obtidas do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.	28
Tabela 7. Frequência de detecção dos genes de resistência pesquisados em isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidos do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.	33
Tabela 8. Frequência de detecção dos genes de resistência pesquisados em isolados de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> e espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa obtidos do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.	34
Tabela 9. Resumo da resistência fenotípica e genotípica observada em isolados de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp. e <i>Escherichia coli</i> obtidos do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas e limpas-contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.	34
Tabela 10. Resumo da resistência fenotípica e genotípica observada em isolados de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp. e <i>Escherichia coli</i> obtidos do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período	

intraoperatório em cirurgias contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.....	36
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma de coleta e processamento das amostras obtidas das mãos do cirurgião, sítio cirúrgico superficial de cães e ambiente da sala operatória durante o período intraoperatório de cirurgias limpas/limpas contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola localizado no estado de São Paulo, Brasil. 18
- Figura 2.** Distribuição percentual de isolados de *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *E. coli* obtidos do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019. 29
- Figura 3.** Distribuição percentual de isolados de espécies de *Staphylococcus* obtidos do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019. ... 30
- Figura 4.** Distribuição percentual de espécies de *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Escherichia coli* obtidas do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas/limpas-contaminadas (G1) e contaminadas (G2) em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019. 31
- Figura 5.** Frequência de detecção dos genes de resistência pesquisados em *Staphylococcus* sp. por fonte de coleta (A) e em *S. pseudintermedius* e espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa (B) obtidas do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019..... 32
- Figura 6.** Dendrograma produzido pela comparação dos padrões de bandas em PFGE de *Staphylococcus pseudintermedius* (A), *S. haemolyticus* (B), *S. epidermidis* (C) e outras espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativa (D) isoladas do sítio cirúrgico superficial de cães (vermelho), mãos dos cirurgiões (verde) e sala operatória (azul) durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019. 39
- Figura 7.** Dendrograma produzido pela comparação dos padrões de bandas em PFGE de isolados de *Enterococcus* spp. (A) e *Escherichia coli* (B) isoladas do sítio cirúrgico superficial de cães (vermelho), mãos dos cirurgiões (verde) e sala operatória (azul) durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019. 40

1 INTRODUÇÃO

Infecções causadas por organismos resistentes à múltiplas drogas (MDR-“multidrug-resistant”), atualmente, representam um dos maiores desafios dentro do contexto de saúde única, devido à capacidade de aumentar a morbimortalidade, e custos associados à cuidados com saúde. Bactérias classificadas como MDR exibem resistência a pelo menos um fármaco representante de três ou mais classes de antimicrobianos, o que limita drasticamente as opções de tratamento de infecções bacterianas.

O ambiente veterinário é reportado como um dos principais fatores de risco para adquirir patógenos resistentes durante o período de hospitalização. A presença de reservatórios comunitários de bactérias multirresistentes nesses ambientes pode contribuir com o aumento da prevalência desses isolados em unidades de terapia intensiva (UTIs) e centros cirúrgicos, e consequentemente comprometendo o tratamento e prognóstico dos pacientes (Brusselaers *et al.*, 2011; Suthar *et al.*, 2014).

Staphylococcus spp. resistente à meticilina (MRS-“Methicillin-resistant *Staphylococcus* spp.”), *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE-“Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.”) e Enterobacterales produtoras de β -Lactamase de espectro estendido (ESBL-“Extended-Spectrum β -Lactamase producing Enterobacterales”), como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*, são os patógenos mais comuns causando infecções em pacientes veterinários criticamente doentes (Brusselaers *et al.*, 2011; Suthar *et al.*, 2014).

Apesar de dados epidemiológicos na veterinária no Brasil serem escassos, alguns estudos têm reportado alta prevalência dessas espécies colonizando ou causando infecções em pacientes, especialmente MRS e ESBL. Adicionalmente, estudos no âmbito global tem documentado a colonização de pacientes, profissionais de saúde e ambientes hospitalares veterinários por bactérias MDR.

O carreamento dessas bactérias como microrganismos comensais e ambientais pode contribuir para o desenvolvimento de infecções do sítio cirúrgico (ISC), assim como para a disseminação de bactérias multirresistentes entre humanos e cães. Alguns estudos já reportaram cepas bacterianas geneticamente relacionadas isoladas de humanos, pacientes veterinários e o ambiente. Nesse sentido, estudos epidemiológicos moleculares possibilitam triagem e melhor elucidação de potenciais

reservatórios e da dinâmica da resistência bacteriana em ambientes veterinários, buscando desenvolver estratégias para superar esses desafios.

Nesse sentido, o presente estudo epidemiológico transversal teve como objetivo determinar a ocorrência de genes de resistência e do perfil de bandas em eletroforese de campo pulsado (PFGE-“Pulsed-field gel electrophoresis”) de *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *E. coli* isolados do sítio cirúrgico superficial (SS) de cães, mãos do cirurgião e do centro cirúrgico durante o período intraoperatório de cirurgias limpas/limpas contaminadas e contaminadas, em um hospital escola veterinário localizado no sudeste do Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O fenômeno da resistência aos antimicrobianos na saúde coletiva multiespécie

As bactérias são organismos unicelulares e possuem alta capacidade de multiplicação. Foram descritas pela primeira vez por van Leeuwenhoek, próximo ao ano de 1670. Porém, apenas no século XIX foram associadas a causas de processos infecciosos, como tuberculose, cólera e febre tifoide. A partir dessa época, iniciaram-se importantes pesquisas visando a descoberta de agentes químicos que possuíssem atividade contra esses microrganismos, com o principal marco no tratamento das infecções bacterianas a descoberta da penicilina, em 1928, por Alexander Fleming (Guimaraes *et al.*, 2010).

Nos últimos 70 anos, mais de 25 classes de antibióticos foram produzidos, porém foram poucas as novas classes descobertas desde 1987 (Anderson *et al.* 2019). Entre os principais motivos dessa janela de descobertas está a falta de investimento em pesquisa e desenvolvimento de fármacos com potencial antimicrobiano pela indústria farmacêutica privada, principalmente por não serem considerados produtos com alto potencial de lucro. Ao mesmo tempo, nota-se falta de investimento público suficiente para que pesquisas na linha de inovação de medicamentos antimicrobianos sejam estimuladas, buscando avançar em estratégias de tratamento eficazes e acessíveis (Dutescu, 2021).

Apesar dos grandes avanços que a descoberta dos antibióticos trouxe para a saúde humana e animal, paradoxalmente, o amplo uso desses fármacos vem

representando grande ameaça para a saúde pública mundial (Brusselaers *et al.*, 2011; WHO, 2019a). Desde a descoberta da penicilina, Alexander Fleming já alertava sobre a possibilidade de bactérias adquirirem resistência. Apesar de representar fenômeno natural, a pressão de seleção imposta pelo uso indevido e excessivo de antimicrobianos e o acesso das bactérias a ampla diversidade de genes de resistência vem contribuindo para a rápida evolução devido à grande capacidade de adaptação desses microrganismos em curto período, acarretando infecções com altas taxas de morbidade e mortalidade (Schwarz *et al.*, 2016).

Atualmente, a resistência bacteriana aos antimicrobianos está entre uma das principais crises sanitárias globais que ameaçam a nossa capacidade em tratar infecções (McEwen e Collignon, 2018). O evento da resistência aos antimicrobianos caracteriza-se pela capacidade de microrganismos adquirirem resistência a um fármaco previamente eficaz para o tratamento da infecção (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2021). Microbiologistas e especialistas em doenças infecciosas vêm reconhecendo o problema há tempos e definindo o contexto atual mundialmente como “Pandemia silenciosa”, no qual ações urgentes são necessárias e devem ser manejadas mais efetivamente e não adiadas como problema futuro (McEwen e Collignon, 2018; Founou *et al.*, 2021).

De acordo com estimativas globais, o número de mortes diretamente relacionadas à resistência bacteriana aumentou para mais de 1,2 milhão em 2019, com a previsão de atingir, aproximadamente, 10 milhões de mortes por ano até 2050, caso ações insuficientes sejam tomadas para controlar esse problema, podendo tornar-se a principal causa de morte no mundo (Tang *et al.*, 2023).

Muitos agentes infecciosos que inicialmente poderiam ser facilmente tratados com diferentes antibióticos disponíveis, têm adquirido resistência e, em alguns casos, virtualmente a todos antimicrobianos previamente eficazes (McEwen e Collignon, 2018). Nesse sentido, as chamadas “superbactérias”, aquelas que apresentam resistência à múltiplos fármacos antimicrobianos, tem aumentado exponencialmente a prevalência em várias regiões do planeta, ao passo que a descoberta e o desenvolvimento de novas classes de medicamentos diminuíram drasticamente nesse quase um século do uso clínico de antimicrobianos (McEwen e Collignon, 2018).

Dentro das diversas causas para o crescimento exponencial dessas bactérias, o uso indiscriminado desses fármacos valiosos em múltiplos setores de saúde humana, veterinária e na produção de alimentos, é considerado como o principal problema a ser abordado nas estratégias de mitigação da resistência bacteriana (McEwen e Collignon, 2018; Tang *et al.*, 2023). Através do processo de seleção natural darwiniana, as bactérias expostas à pressão de seleção impostas pelo uso de antimicrobianos aumentam a aptidão, adquirindo, expressando e compartilhando genes de resistência. Outros fatores que contribuem para a disseminação de bactérias resistentes e seus genes, em nível local e global, incluem: controle inadequado de infecções, contaminação ambiental e a mobilidade geográfica de pessoas e outros animais infectados, ou pela comercialização de produtos de origem animal (Holmes *et al.*, 2016; McEwen e Collignon, 2018).

O compartilhamento dos genes de resistência adquiridos, seja por transmissão vertical (mutação) ou horizontal (conjugação, transdução e transformação) ocorre de forma fácil e eficiente entre animais humanos e não humanos e o ambiente, fazendo com que vários setores sejam mutuamente afetados. Dessa forma, o fenômeno da resistência aos antimicrobianos pode ser definido como problema ecológico que se caracteriza por interações complexas, multifatoriais e multissetoriais envolvendo diversas populações microbianas (McEwen e Collignon, 2018).

Entre as principais estratégias para mitigar a resistência bacteriana destacam-se ações educativas voltadas à redução do uso desnecessário de antimicrobianos e o incentivo ao desenvolvimento de novos fármacos terapêuticos. Para alcançar esses objetivos, é essencial estabelecer diretrizes e políticas que promovam o uso racional de antimicrobianos, implementar vigilância epidemiológica eficiente, restringir a prescrição e comercialização inadequadas, além de fomentar a criação de medicamentos com foco prioritário na promoção da saúde coletiva multiespécie, em vez de apenas atender os interesses econômicos (Dutescu, 2021).

2.2 Vigilância epidemiológica

À medida em que a eficácia do arsenal terapêutico para o tratamento de infecções bacterianas foi progressivamente reduzida devido ao desenvolvimento e disseminação de genes de resistência entre as populações bacterianas nosocomiais e comunitárias, a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou, em 2015, o Plano de

Ação Global sobre Resistência aos Antimicrobianos (GLASS – “Global Antimicrobial Resistance Surveillance System”), buscando adequada vigilância epidemiológica para a elaboração de estratégias que mitiguem essa ameaça em âmbito internacional. Esse sistema de vigilância combina dados epidemiológicos de pacientes (hospitalizados e ambulatoriais) e laboratórios clínicos para aprimorar a compreensão do impacto da resistência bacteriana na saúde e na sociedade, buscando avaliar de forma apropriada os padrões e tendências de resistência local e global (WHO, 2015; Pilloneto *et al.* 2021).

Os dados observados no GLASS mostram que países que possuem baixo consumo de antimicrobianos, legislações restritivas para o uso desses fármacos, principalmente como promotores de crescimento, e regulação efetiva de empresas farmacêuticas, apresentam as menores taxas de resistência no mundo. Como exemplo, países nórdicos, como Dinamarca, Suécia, Finlândia e Noruega, que possuem regulamentação bastante restritiva para a venda e uso de antimicrobianos em humanos e outros animais, apresentam as menores taxas de resistência no mundo. Nesses países, o consumo de antimicrobianos por 1000 habitantes está entre 4118 e 5787 doses diária definida (DDD), enquanto as taxas de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e *E. coli* resistente à cefalosporinas de terceira geração variam de 1-3% e 4-7%, respectivamente (WHO, 2025; The Center for Disease Dynamics Economics and Policy, 2019; Dutescu, 2021).

Quando consideramos países sem regulamentações restritivas e nos quais empresas farmacêuticas possuem mais liberdade para venda, como Estados Unidos, as taxas de consumo aumentam para 8307 DDD e as taxas de resistência à *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e *E. coli* resistente à cefalosporinas de terceira geração aumentam para 45% e 15%, respectivamente (The Center for Disease Dynamics Economics and Policy, 2019). Além desses fatores, nos dados aglomerados no GLASS até o momento, observa-se também que países criticamente marcados por desigualdades sociais, com alto consumo de antimicrobianos e sem regulamentações efetivas apresentam taxas elevadas de resistência, como Brasil, Argentina, Venezuela, Equador, Índia e Estados Unidos. Além das taxas elevadas de resistência, o acesso à tratamentos eficazes e de qualidade é limitado a uma parcela

da população (WHO, 2025; The Center for Disease Dynamics Economics and Policy, 2019; Dutescu, 2021).

No Brasil, desde 2014, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) coleta e interpreta informações sistemáticas de todos os hospitais com leitos de terapia intensiva em relação às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), com foco nas infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateteres e marcadores de resistência bacteriana. Em 2017, 72% dos hospitais brasileiros participaram do programa de vigilância. Nas unidades de terapia intensiva (UTI) de adultos e pediátricas, observou-se altas taxas de resistência, com *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina, *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos destacando-se entre os principais patógenos causadores de infecções sanguíneas (ANVISA, 2017; Pilloneto *et al.*, 2021). Ainda em 2017, o Brasil aderiu ao GLASS, tendo reportado seus primeiros dados consolidados em 2019.

Os dados reportados apresentam predominância de bactérias Gram-negativas (>65%) nesses pacientes, e os isolados adquiridos na comunidade foram majoritariamente provenientes de infecções urinária por *Escherichia coli*. No entanto, *Staphylococcus aureus* também figuram como causa relevante de infecções comunitárias, perfazendo quase 25% do total de isolados. Além dessas espécies, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus* spp. também foram frequentemente reportados como causadores de infecções graves em humanos (Moraes *et al.*, 2000; Sader *et al.*, 2001; Rice, 2008; Marra *et al.* 2011; ANVISA, 2017; Braga *et al.*, 2018; Pilloneto *et al.* 2021; Zarpellon *et al.*, 2018).

Apesar de estudos e estratégias de vigilância epidemiológica estarem avançando na medicina humana no Brasil e no mundo, nos setores veterinários ainda existem muitas lacunas. Dados reportados mundialmente, nos últimos anos, demonstram taxas alarmantes de resistência de diferentes bactérias de importância clínica. Países como Brasil, Irã, Itália, Nigéria, Polônia, Portugal, África do Sul e Suíça (Menandro *et al.*, 2019; Teixeira *et al.*, 2019; Dazio *et al.*, 2021; Menezes *et al.*, 2021; Menezes *et al.*, 2022; Moses *et al.*, 2022; Prior *et al.*, 2022; Viegas *et al.* 2022; Miszczak *et al.*, 2023; Naziri *et al.*, 2023; Araújo *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2024) apresentaram taxas de prevalência de MRS entre 10 e 85,9%. No Brasil, dados reportados também mostram taxas alarmantes de *Staphylococcus* spp.,

Pseudomonas aeruginosa e membros da família Enterobacteriaceae resistentes à fluoroquinolonas, com taxas de resistência podendo chegar até 100% em alguns estudos (Menezes *et al.*, 2021; Arais *et al.*, 2016; Gheller *et al.*, 2017).

Porém, a falta de um banco de dados epidemiológico consistente e amplo sobre o perfil fenotípico e genético de bactérias causadoras de infecções na medicina veterinária tem limitado drasticamente a elaboração de estratégias para controle da transmissão e disseminação desses isolados entre ambiente, humanos e outros animais, assim como possibilidades de tratamento eficazes. Dessa forma, estudos e pesquisas epidemiológicas tornam-se primordiais para contribuir na elaboração de planos de ações eficazes que mitiguem os impactos da resistência bacteriana aos antimicrobianos.

2.3 Bactérias causadoras de infecções

2.3.1 *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus spp. são um gênero de bactérias Gram-positivas caracterizadas pela presença da enzima catalase, que é considerada um fator de virulência, uma vez que impedem que os neutrófilos causem a morte celular bacteriana (Mandell, 1975). É um grupo de bactérias comensais da pele e mucosas de humanos e animais, porém por sua característica oportunista podem causar afecções clínicas em cães e gatos, como infecções cutâneas, urinárias, otológicas, ortopédicas e respiratória, podendo evoluir para casos graves de sepse (Turk *et al.*, 2015; Chaudhary *et al.*, 2017; Shoen *et al.*, 2019).

Podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com a produção ou não da enzima coagulase. As principais espécies estafilocócicas coagulase-positiva são *S. aureus* e *S. pseudintermedius*, esta última a mais prevalente em cães e gatos. Entre espécies coagulase-negativa, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* são as mais prevalentes em animais humanos e não humanos, representando importantes patógenos causadores de infecções nosocomiais graves (Chaudhary *et al.*, 2017; Shoen *et al.*, 2019; Dazio *et al.*, 2021; Viegas *et al.*, 2022).

A primeira cepa de *Staphylococcus* spp. resistente à penicilina foi relatada em 1940, três anos antes do início do uso clínico desse antibiótico (Ventola, 2015). O principal mecanismo de resistência à penicilina ocorre pela produção de enzimas extracelulares denominadas β -lactamases. As β -lactamases inibem a ação dos beta-

lactâmicos ao clivar o anel beta-lactâmico, mecanismo essencial para a ação dessa classe de antimicrobianos. O gene *blaZ* é o responsável pela produção dessas enzimas e geralmente está localizado no material genômico, porém também pode estar presente em plasmídeos (Pimenta *et al.*, 2023).

Duas décadas depois do relato resistência à penicilina, foram isoladas as primeiras cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (Ventola, 2015; Rolo *et al.*, 2017) e, desde então, isolados de *Staphylococcus* spp. resistente à meticilina tem emergido mundialmente nas últimas décadas (Duim *et al.*, 2016; Pires *et al.*, 2016). A resistência a meticilina está associada com o gene *mecA*, o qual codifica uma proteína ligadora de penicilina extra e confere resistência a todos fármacos da classe dos β -lactâmicos, com exceção à cefalosporinas de quinta geração. Esse gene está localizado no “Staphylococcal cassette chromosome *mec*” (SCC*mec*) (Ventola, 2015; Rolo, 2017).

Frequentemente, isolados MRS também apresentam resistência à outras classes de antimicrobianos e são classificadas como resistentes à múltiplas drogas. A resistência à fármacos aminoglicosídeos, como gentamicina, tobramicina, canamicina e amicacina, é outro importante mecanismo de resistência dessas espécies. O gene *aacA-aphD*, geralmente está presente no plasmídeo, cromossomo ou em ambos e é responsável pela expressão de resistência a essa classe de antibióticos (Udou, 2001).

A resistência cruzada à macrolídeos, lincosaminas e estreptogramina B (MLS_b) também é frequente em espécies de *Staphylococcus* spp., geralmente causada pela expressão do gene *erm*, o qual altera o sítio de ação do antibiótico. Aproximadamente, 80% das bactérias MRS apresentam resistência aos antibióticos dessa classe (Miklasińska-Majdanik, 2021). A resistência à tetraciclina também tem sido alarmante devido ao uso indiscriminado desses antibióticos na rotina clínica veterinária e na produção animal. O gene *tet(M)* codifica uma proteína de proteção ribossomal que reduz a afinidade dos ribossomos pela tetraciclina na presença de GTP, sendo um dos genes do complexo *tet* responsável pela resistência às tetraciclinas (Burdett, 1996).

2.3.2 *Enterococcus* spp.

Enterococcus spp. são bactérias Gram-positivas, aeróbias facultativas, habitantes naturais do trato gastrointestinal em humanos e muitas outras espécies

animais, incluindo animais de produção e de companhia. São contaminantes ambientais e em alimentos, se inserindo na cadeia alimentar e facilmente transmitidos (Torres *et al.*, 2018).

Dessa forma, espécies do gênero *Enterococcus* são importantes patógenos oportunistas, especialmente *E. faecalis* e *E. faecium*, que podem causar ampla variedade de infecções, principalmente em pacientes imunossuprimidos (Torres *et al.*, 2018). Esses microrganismos além de possuir diferentes mecanismos intrínsecos de resistência a vários agentes antimicrobianos, também têm a capacidade de adquirir novos mecanismos de resistência, o que acarreta uma limitação importante nas alternativas de tratamento disponíveis (Torres *et al.*, 2018).

Entre os principais mecanismos de resistência naturais estão a resistência à fármacos da classe dos β -lactâmicos, exibindo resistência à cefalosporinas e susceptibilidade reduzida às penicilinas, devido à expressão de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) de baixa afinidade (Hollenbeck e Rice, 2012). A expressão do gene *blaZ*, por mecanismo semelhante ao citado anteriormente em *Staphylococcus* spp., pode codificar resistência adquirida à ampicilina (Torres *et al.*, 2018).

Esses microrganismos também são intrinsicamente resistentes à baixas concentrações de aminoglicosídeos, que são as concentrações normalmente utilizadas clinicamente, devido à baixa permeabilidade da parede celular. A resistência a altos níveis de aminoglicosídeos pode ser adquirida e, geralmente, é codificada pela famílias dos genes *aacA-aphD* que codificam uma enzima bifuncional, conferindo resistência à gentamicina, canamicina, amicacina, netilmicina e tobramicina (Torres *et al.*, 2018).

A resistência às tetraciclina, como tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina, representam um dos mecanismos de resistência adquiridos mais prevalente nessas espécies. Os genes relacionados mais frequentemente são aqueles implicados com a proteção ribossomal, como *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, e efluxo ou inativação enzimática, como *tet(K)* e *tet(L)* (Franke e Clewell, 1980; Torres *et al.*, 2018). Esses genes podem ser facilmente transferidos, mesmo na ausência de plasmídeos (Franke e Clewell, 1980), devido a família *Tn916/Tn1545* de transposons conjugativos que carrega o gene *tet(M)*, geralmente em combinação com o gene *ermB*,

um dos responsáveis mais prevalente pela resistência aos antibióticos MLS_b (Torres *et al.*, 2018).

2.3.3 *Escherichia coli*

E. coli está entre as espécies de bactérias anaeróbias facultativas Gram-negativas mais prevalentes colonizando o trato gastrointestinal de humanos e animais. Apesar de comensal da microbiota intestinal, essa espécie é responsável por causar diversas infecções, podendo acarretar infecções graves devido fatores patogênicos ou de virulência toxigênica (Friedman *et al.*, 2002; Akbar e Anal, 2011; Arbab *et al.*, 2022). Além disso, são bactérias comensais capazes de carrear genes de resistência sem infecção ativa, disseminando-se facilmente pela contaminação de ambientes com fezes (Salgado-Caxito *et al.*, 2021a; Salgado-Caxito *et al.*, 2021b).

Entre os microrganismos da família Enterobacteriaceae a produção de β -lactamase de espectro estendido é o principal mecanismo de resistência aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (Laudy *et al.*, 2017). A produção dessas enzimas leva à hidrólise de penicilinas, cefalosporinas e aztreonam, porém são inativadas pelos inibidores de β -lactamase, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, e apresentam-se, geralmente, sensíveis aos carbapenêmicos (Laudy *et al.*, 2017). As principais ESBLs caracterizadas até o momento são derivadas das variantes dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} (Laudy *et al.*, 2017).

Adicionalmente, outro importante mecanismo de resistência em espécies de enterobactérias está relacionado a produção de carbapenemases, o qual decorre da aquisição de genes de resistência como *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA} e codifica resistência a todos agentes do grupo dos β -lactâmicos (Logan e Weinstein, 2017). O gene responsável pela resistência a colistina mediada por plasmídeo (*mcr*) também foi descrito em enterobactérias de animais, alimentos e humanos, e, atualmente, representa um dos mais preocupantes mecanismos de resistência bacteriana no contexto da saúde pública mundial devido ao alto potencial de disseminação, e relatado nos países da América do Sul (Fernandes *et al.*, 2016).

2.4 Reservatórios de bactérias resistentes

Em todos os locais onde são utilizados antimicrobianos, existem reservatórios de resistência, incluindo ambientes hospitalares humanos e veterinários,

comunidades e indústria de produção animal. Além disso, bactérias resistentes podem ser encontradas em diferentes ambientes terrestres e aquáticos, como na água, solo, e muitos outros nichos ecológicos nos quais são despejados esgoto, resíduo da indústria farmacêutica e escoamento de fezes (McEwen e Collignon, 2018; Hanczvikkel e Tóth, 2018).

O ambiente hospitalar veterinário tem sido reportado como o principal fator de risco na aquisição de patógenos resistentes por cães hospitalizados. O aumento de reservatórios de bactérias multirresistentes na comunidade resulta na persistência desses microrganismos nas Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) em hospitais, onde se encontra a população mais vulnerável às infecções (Suthar *et al.*, 2014; Foschi *et al.*, 2022). As principais espécies nesses ambientes são as Gram-positivas *Staphylococcus* spp. resistente à meticilina, *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina, e as Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* e *Proteus mirabilis* (Brusselaers *et al.*, 2011; Suthar *et al.*, 2014; Foschi *et al.*, 2022).

2.5 Técnicas moleculares para caracterização bacteriana

Testes morfológicos e bioquímicos, apesar de importantes na identificação clínica de rotina dos gêneros e/ou espécies de bactérias isoladas, possuem acurácia limitada. Nesse sentido, o diagnóstico molecular representa alternativa não apenas para objetivos de pesquisa, mas também para auxiliar no diagnóstico de infecções bacterianas na rotina clínica de laboratórios de microbiologia e para adequada vigilância epidemiológica. Entre testes tecnicamente simples e poucos onerosos para identificação de espécies e genes de resistência amplamente utilizados na pesquisa estão a técnica de espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-TOF MS – “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry”) e a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR - “Polymerase chain reaction”) (Sauer *et al.*, 2008; Freiwald e Sauer, 2009; Canene-Adams, 2013). Enquanto para caracterização do perfil genético isolados bacterianos, a técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE - *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) é considerada como “padrão ouro” na comparação de estirpes, principalmente quando não é possível a realização do sequenciamento completo do genoma (Lopez-Canovas *et al.*, 2019).

2.5.1 MALDI-TOF

Abordagens de espectrometria de massas que utilizam a preparação molecular de amostras biológicas têm sido expandidas nos últimos anos. MALDI-TOF MS é uma das técnicas mais conhecidas e, recentemente, amplamente utilizada para tipificação de espécimes bacterianos na rotina clínica e na pesquisa. A identificação bacteriana por determinação do perfil de proteínas das células bacterianas por MALDI-TOF MS é conveniente, rápida, acurada e com bom custo-benefício (Sauer *et al.*, 2008; Freiwald e Sauer, 2009).

Resumidamente, a técnica consiste em transferir repique recente de amostra previamente purificada e com alta massa bacteriana em uma placa de amostra que será exposta à irradiação a laser. Em seguida, após adição e secagem da matriz, a placa é inserida no espectrômetro de massas, onde será irradiada com o laser, ionizando as proteínas presentes nas bactérias (principalmente proteínas ribossomais). O ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) é a matriz primária utilizada e responsável por (1) absorver eficientemente a energia do laser, (2) promover a ionização do isolado ao fornecer prótons e (3) prevenir a degradação do microrganismo (Tsuchida *et al.*, 2020).

A razão massa/carga (m/z) dos componentes proteicos é determinada pelo tempo necessário para que essas proteínas ionizadas alcancem o detector, ou seja, pelo tempo de voo. A intensidade do sinal fornecerá um espectro de massa (padrão) que será comparado com os espectros de um banco de dados de referência em software. Assim, será reportado as melhores correspondências do perfil de proteínas da amostra biológica em relação ao banco de dados, assim como o escore de confiabilidade da identificação (Tsuchida *et al.*, 2020).

O MALDI-TOF MS possibilita a identificação de microrganismos em estágios mais precoces, reduzindo em 1 dia o período para identificação em relação aos testes morfológicos e fenotípicos convencionais. Esse fato, quando aplicado na rotina clínica, pode resultar em intervenções antecipadas com terapias empíricas, acarretando em resposta clínica mais rápida (Sauer *et al.*, 2008; Freiwald e Sauer, 2009; Tsuchida *et al.*, 2020).

2.5.2 PCR

O principal objetivo da PCR convencional é amplificar cópias de uma região específica do DNA ou RNA, possibilitando adequada detecção desses segmentos através de eletroforese em gel de agarose. Uma das principais aplicações dessa técnica é o diagnóstico de microrganismos, principalmente bactérias e vírus (Canene-Adams, 2013). Nas últimas décadas, essa técnica tem sido amplamente utilizada para triagem e detecção de genes de resistência, tanto em isolados bacterianos como em amostras de tecido ou fluidos orgânicos, como sangue (Nusbaum, 1990).

A reação ocorre em três etapas principais: desnaturação, anelamento e extensão. Essas etapas são repetidas em ciclos até que ocorra amplificação suficiente. Em seguida, a desnaturação separa o DNA de fita dupla em fita simples e os primers se pareiam com suas sequências complementares presentes no DNA dos isolados. Após o anelamento e início do processo de cópia, as fitas de DNA serão copiadas durante a etapa final de extensão (Canene-Adams, 2013).

2.5.3 PFGE

A eletroforese em gel de campo pulsado, técnica desenvolvida por Schwartz e Cantor (1984), é uma metodologia considerada por muitos anos como o “padrão ouro” para caracterização de diversos organismos patogênicos, assim como tipificação de espécies bacterianas causadoras de surtos infecciosos (Lopez-Canovas *et al.*, 2019). A PFGE possibilita organizar o DNA cromossômico intacto de eucariotos unicelulares, como fungos, leveduras e parasitas, em padrões de bandas chamados cariótipos eletroforéticos, assim como separar fragmentos macro restritivos do genoma bacteriano em padrões de bandas denominados pulsotipos ou impressões digitais de DNA (“DNA fingerprints”), e facilitar o estudo de rearranjos cromossômicos extensos do genoma humano (Lopez-Canovas *et al.*, 2019).

Atualmente, a determinação do perfil eletroforético do DNA bacteriano é a principal aplicação da técnica, fornecendo informações para identificar origens clonais de isolados em surtos de infecção, e para rastrear possíveis fontes de contaminação, e rotas de transmissão e disseminação, apresentando-se como método menos oneroso do que as técnicas de sequenciamento do genoma completo (Lopez-Canovas *et al.*, 2019; Neoh *et al.*, 2019).

A técnica de PFGE resume-se em obter o DNA intacto pela imobilização das células em blocos de agarose, seguida da lise e desproteínização do DNA *in situ*, principalmente pela utilização de enzimas restritivas (Lopez-Canovas *et al.*, 2019). O princípio da técnica de separação do DNA (moléculas entre 20kb e 5Mb) é baseado na alternância da direção da aplicação de dois campos elétricos e na habilidade das moléculas se reorientarem dependendo do seu tamanho. Dessa forma, moléculas menores se reorientam mais rapidamente que moléculas maiores, acarretando sua separação (Lopez-Canovas *et al.*, 2019; Neoh *et al.*, 2019).

Após a obtenção do padrão de bandas, o gel é analisado em software, como GelCompar, Molecular Analyst Fingerprinting, BioImage, Phoretix ou BioNumerics, que atribuirá linhagens com base no incremento de diferenças de bandas e utilizará coeficientes de similaridade baseados em bandas, como Dice, Jaccard ou Pearson (Neoh *et al.*, 2019). Dendrogramas podem ser construídos por meio de algoritmos como o Método de Agrupamento Não Ponderado com Média Aritmética (UPGMA - “Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averaging”) ou o método de Junção de Vizinhos (NJ – “Neighbor-Joining”). As árvores filogenéticas possibilitam, então, a comparação da relação genética e a atribuição clonal (Félix *et al.*, 2015). Coeficientes de similaridade de maiores que 80% consideram os isolados geneticamente relacionados, identificando possíveis clones (McDougal *et al.*, 2003).

3 HIPÓTESE

A hipótese formulada é de que o ambiente cirúrgico de hospital escola veterinário serve como possível fonte de bactérias portadoras de genes de resistência de relevância clínica, além de possibilitar o compartilhamento de isolados entre pacientes, equipe cirúrgica e o próprio ambiente.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar geneticamente *E. coli*, e espécies de *Staphylococcus*, *Enterococcus* isoladas no sítio cirúrgico superficial de cães, mãos dos cirurgiões e da sala operatória durante o período intraoperatório, além de comparar a diversidade genética entre essas diferentes fontes.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (1) Identificar *E. coli*, e espécies de *Staphylococcus* e *Enterococcus* presentes no ambiente cirúrgico;
- (2) Detectar genes de resistência selecionados em isolados de *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *E. coli* do ambiente cirúrgico;
- (3) Determinar o perfil genético dos isolados de *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *E. coli* do ambiente cirúrgico.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos Éticos

Este estudo está de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e do Conselho Nacional de Saúde (CNS) do Brasil, aprovado pelo Comitê de Ética Institucional no Uso de Animais (protocolo nº 5436/20), pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 07111419.4.0000.9029 e 39163720.5.0000.9029) e pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) (protocolo nº A621D91). Os tutores dos cães e as pessoas responsáveis pela cirurgia foram informados sobre os métodos e objetivos do estudo e forneceram consentimento informado por escrito.

5.2 Desenho do estudo e população

Este é um estudo epidemiológico de corte transversal, conduzido em um hospital veterinário-escola no estado de São Paulo, Brasil. Foram obtidos 75 isolados provenientes do sítio cirúrgico superficial (SS) de 30 cães (n=40), que não haviam recebido terapia antimicrobiana nas 72 horas anteriores à coleta, bem como do ambiente da sala cirúrgica (n=27) e de 8 cirurgiões veterinários (n=8), durante 30 procedimentos distintos. Esses cães foram submetidos a cirurgias classificadas como limpas/limpas-contaminadas (G1 [n = 20]) ou contaminadas (G2 [n = 10]). As feridas cirúrgicas foram classificadas de acordo com o Apêndice A.

Todos os cães selecionados foram submetidos ao exame físico, hematológico, bioquímico sérico e cardiológico necessário para avaliação clínica pré-operatória.

5.3 Preparação do paciente e equipe cirúrgica

A indução e manutenção anestésica foram realizadas conforme a classificação ASA (American Society of Anesthesiologists) para cada paciente, seguindo o protocolo do setor de Anestesiologia de Pequenos Animais (Mayhew, 2019). A cefazolina sódica (25 mg/kg, IV) foi administrada entre 30 e 60 minutos antes da incisão cirúrgica, com reaplicações a cada 90 minutos durante o procedimento. No pós-operatório, a prescrição de antimicrobianos variou conforme a decisão do cirurgião responsável.

A antisepsia cirúrgica das mãos foi realizada com solução de clorexidina 2% ou iodopovidona 2% por 3 a 5 minutos. A tricotomia ampla foi feita com lâmina de tricotomizador nº 40, na sala de preparo cirúrgico ou após a indução anestésica na mesa de cirurgia, conforme a preferência do cirurgião. A antisepsia prévia do sítio cirúrgico foi realizada com solução de clorexidina 2% e álcool isopropílico 70%, enquanto a antisepsia definitiva seguiu o mesmo protocolo ou foi realizada com solução alcoólica de clorexidina 0,5%.

5.4 Amostragem

Os isolados utilizados neste estudo foram provenientes de uma bacterioteca obtida por amostragem de conveniência em estudo anterior previamente publicado (Menezes *et al.*, 2022). As amostras foram coletadas utilizando um cotonete estéril com ponta de algodão seco, transportado em tubo estéril contendo solução de peptona bacteriológica a 0,1%. Para as amostras dos cirurgiões, o cotonete estéril foi friccionado, antes e após a antisepsia cirúrgica das mãos, em movimentos circulares do punho até as pontas dos dedos (incluindo as superfícies dorsal e palmar), repetindo o procedimento três vezes para cada dedo. Para as amostras da pele dos cães, o cotonete estéril foi friccionado sobre o sítio cirúrgico superficial, após incisão cirúrgica. Em seguida, os cotonetes foram inoculados em ágar sangue bovino a 5% (Oxoid, Reino Unido).

As amostras ambientais foram coletadas por exposição passiva, utilizando uma placa de Petri com ágar “Brain Heart Infusion” (BHI; Oxoid, Reino Unido), que permaneceu aberta durante todo o procedimento em um suporte de 1 metro de altura e 20 cm de distância da mesa cirúrgica.

Todas as amostras foram incubadas a 37°C por 24 horas, sob condições aeróbicas. Colônias morfológicamente distintas foram selecionadas de cada amostra para análises subsequentes. Cada colônia obtida foi preservada em caldo BHI com solução de glicerol a 30% (1:1) a -80 °C.

A figura 1 resume a metodologia de coleta e processamento das amostras.

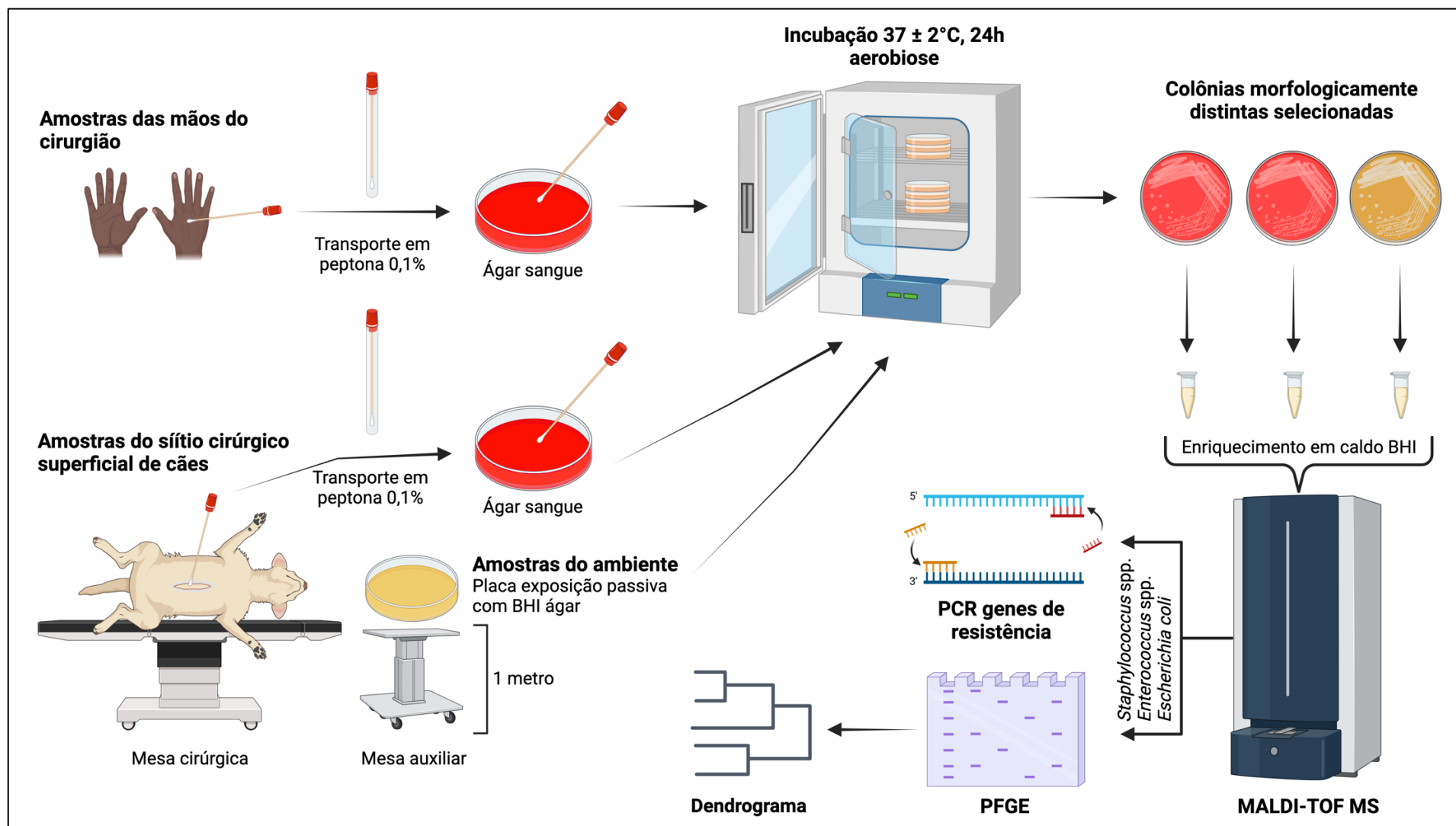


Figura 1. Fluxograma de coleta e processamento das amostras obtidas das mãos do cirurgião, sítio cirúrgico superficial de cães e ambiente da sala operatória durante o período intraoperatório de cirurgias limpas/limpas contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola localizado no estado de São Paulo, Brasil.

A ferida cirúrgica foi monitorada até trinta dias de pós-operatório para o desenvolvimento de sinais de hiperemia, edema, sensibilidade dolorosa, drenagem de secreção serosa e/ou purulenta, deiscência de sutura, abscesso e fistulações. Quando observado três ou mais dos sinais clínicos citados anteriormente ou na presença de secreção purulenta, a ferida foi classificada como infectada. Quando identificada infecção pós-operatória do sítio cirúrgico incisional superficial foi realizado nova colheita de material. Após limpeza da ferida, com solução salina estéril a 0,9%, o cotonete foi friccionado na pele e tecido subcutâneo. Os animais que não retornaram para avaliação no Hospital Veterinário foram contactados por telefone e questionados sobre os sinais clínicos descritos.

5.5 Identificação das espécies bacterianas

Antes de cada análise, a cultura congelada foi inoculada em caldo BHI com auxílio de uma alça de inoculação de 1 µL e incubadas a 37°C por 24 horas, sob condições aeróbicas.

Para este estudo, foram selecionados, por conveniência, 48 isolados de *Staphylococcus* spp., 19 de *Enterococcus* sp. e 8 de *Escherichia coli* identificados pela técnica MALDI-TOF MS (Tabela 1). A preparação das amostras, aquisição de dados e análise foram realizadas conforme descrito por Sauer *et al.* (2008) e Freiwald e Sauer (2009).

Tabela 1. Número de isolados de *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* obtidos do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.

Espécie	Sítio cirúrgico superficial	Mãos do cirurgião	Ambiente	Total
<i>Staphylococcus</i> spp.	25	6	17	48
<i>Enterococcus</i> spp.	10	3	6	19
<i>E. coli</i>	5	-	3	8

Na etapa de purificação, as estirpes foram cultivadas em um volume de 3 mL de TSB ("Trypit soy broth") e incubadas à 37°C, durante 16 a 24 h, sob condições aeróbicas. A partir da cultura em meio líquido, com bom crescimento, 0,5 mL foram

transferidos para microtubo de 1,5 mL. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 1-2 minutos a 13000 rpm, o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente com auxílio de pipeta automática e desprezado. O precipitado foi, então, ressuspenso cuidadosamente em 500 μ L de água ultrapura estéril e adequadamente homogeneizando com auxílio de pipeta. A suspensão foi centrifugada novamente por 1-2 minutos a 13000 rpm, sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso cuidadosamente em 200 μ L de água ultrapura estéril, e, com auxílio de uma pipeta, homogeneizado adequadamente, evitando a formação de grumos e precipitados indesejáveis. Por fim, 700 μ L de etanol 100% (PA) foram adicionados, procedendo-se homogeneização manual. As amostras foram estocadas entre 2 e 4°C.

Os isolados inativados na etapa anterior foram centrifugados, por 2 minutos a 13000 rpm, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado cuidadosamente. Adicionou-se, então, ao depósito de células, 10 μ L de ácido fórmico 70%, homogeneizando cuidadosamente com pipeta. Em seguida, foram adicionados 10 μ L de acetonitrila (100%) e homogeneizado brevemente no vórtex. As amostras foram então centrifugadas por 2 minutos a 13000 rpm, em temperatura ambiente.

Em seguida, uma alíquota de cada isolado previamente purificado, foi transferida para a placa alvo “BC” de aço polido “MTP 394” (Microflex LT, Bruker Daltonics/ BD, Alemanha, EUA) e, após alguns minutos para rápida secagem, foi adicionada a matriz (ácido α -ciano-4- hidroxicinâmico [HCCA]). Após esse procedimento, os espectros de massa foram obtidos por espectrômetro de massas Autoflex III Smartbeam. O software MALDI Biotyper 3.1 da Bruker Daltonics foi utilizado para identificar os isolados bacterianos com base nos espectros de massa. Foram aplicados os critérios interpretativos padrão da Bruker: escores $\geq 2,0$ foram considerados indicativos de alta confiabilidade em nível de espécie, enquanto escores entre 1,7 e 1,99 indicaram alta confiabilidade a nível de gênero. Isolados com escores $< 1,7$ foram excluídos deste estudo.

5.6 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os testes fenotípicos de resistência aos antimicrobianos foram realizados em estudo prévio já publicado (Menezes *et al.*, 2022). Os isolados foram testados pelo método padrão de difusão em disco de Kirby-Bauer (Bauer e Kirby, 1996) em ágar

Mueller-Hinton (Oxoid, Reino Unido), incubado a 37°C por 18 a 24 horas sob condições aeróbicas. Os diâmetros das zonas de inibição foram medidos de acordo com as diretrizes do CLSI (2018). Os discos de clindamicina e eritromicina foram posicionados a uma distância de 15 mm para a realização do teste de resistência induzível à clindamicina (D-test) em cepas de estafilococos.

5.7 Detecção dos genes de resistência

5.7.1 Extração do DNA bacteriano

A extração de DNA dos isolados de *Staphylococcus spp.* e *Enterococcus spp.* foi realizada seguindo o método proposto por Bag *et al.* (2016) e Moraes *et al.* (2022), com algumas modificações. Resumidamente, alíquotas de 1,5 mL da cultura bacteriana de cada isolado foram centrifugadas a 8000 rpm por 5 minutos a 12 °C para obtenção do pellet celular. O meio de cultura foi descartado, e o pellet bacteriano foi ressuscitado em 700 µL de tampão de extração de DNA [Tris-HCl 160 mM pH 8,0; EDTA 60 mM pH 8,0; NaCl 20 mM; SDS 0,5% (p/v)]. A lise celular ocorreu a 65 °C por 40 minutos. Em seguida, 300 µL de solução de acetato de potássio 5 M foram adicionados, e, após homogeneização, a solução foi mantida em banho de gelo por 30 minutos.

A purificação do DNA foi realizada utilizando 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v/v), seguido de centrifugação a 12000 rpm a 10 °C por 10 minutos. O sobrenadante claro foi transferido para novos tubos, aos quais foram adicionados 1000 µL de etanol absoluto gelado. A solução foi homogeneizada e mantida no freezer a -20 °C por 12 horas para precipitação do DNA. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000 rpm a 10 °C por 17 minutos para obtenção do pellet de DNA. O sobrenadante foi descartado, e o pellet lavado com 700 µL de etanol 70% (v/v), seco a 55 °C e ressuscitado em 30-50 µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0).

O DNA das bactérias Gram-negativas foi obtido utilizando o método de extração por fervura, conforme descrito por Keskimäki *et al.* (2001). Para tanto, alíquotas de 1 mL da suspensão bacteriana, de cada isolado, foi centrifugada a 12000 rpm por 2 minutos a 20 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 1 mL de tampão fosfato-salino (NaH₂PO₄.H₂O 0,2 M; NaH₂PO₄.12H₂O 0,2 M; NaCl 0,14 M; pH 7,2) foi adicionado, procedendo-se adequada homogeneização e centrifugação a 12000 rpm

por 2 minutos, a 20 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 0,5 mL de água deionizada estéril. Procedeu-se a fervura a 100 °C por 10 minutos, seguido de centrifugação a 12000 rpm por 2 minutos, transferência do sobrenadante para outro microtubo e conservação a -20 °C.

5.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os genes de resistência selecionados foram detectados por amplificação por PCR. As condições de PCR para detecção dos genes testados foram realizadas conforme protocolos previamente descritos, disponíveis nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Genes de resistência amplificados por PCR em *Escherichia coli* isoladas do sítio cirúrgico de cães, das mãos de cirurgiões e da sala de operação em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil.

Genes	Sequência de nucleotídeo (5' – 3')	Tamanho (pb)	Etapas da amplificação						Referência
			Denaturação inicial	Denaturação	Anelamento	Extensão	Elongamento	Ciclos	
bla_{TEM-1}	F-GGGGAGCTCATAAAATTCTTGAAGAC R-GGGGGATCCTTACCAATGCTTAATCA	1100	94°C 1min	95°C 30sec	58°C 1min	72°C 1min	72°C 7min	30	Essack <i>et al.</i> , (2001)
bla_{SHV}	F-ATGCGTTATATTCGCCTGTG R-GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG	860	95°C 5min	95°C 30sec	58°C 1min	72°C 1min	72°C 7min	30	Spanu <i>et al.</i> , (2002)
bla_{SHV-1}	F-GCCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC R-TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA	1015	94°C 5min	94°C 30sec	55°C 45sec	72°C 1min	72°C 7min	25	Essack <i>et al.</i> , (2001)
bla_{CTX-M-1, 3 e 15}	F - TTAGGAARTGTGCCGCTGYA R - CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	688	94°C 5min	94°C 30sec	55°C 45sec	72°C 1min	72°C 7min	25	Dallenne <i>et al.</i> , (2010)
bla_{CTX-M-2}	F - CGTTAACGGCACGATGAC R - CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	404	94°C 5min	94°C 30sec	55°C 45sec	72°C 1min	72°C 7min	25	Dallenne <i>et al.</i> , (2010)
bla_{CMY-2}	F - ATGATGAAAAATCGTTATGCT R - TATTGCAGCTTTTCAAGAATGCG	3202	94°C 3min	94°C 30sec	60°C 30sec	72°C 1min	72°C 7min	30	Kojima <i>et al.</i> , (2005)
mcr₁	F - AGTCCGTTTGTCTTGTGGC R - AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	320	94°C 15min	94°C 30sec	58°C 1:30min	72°C 1min	72°C 10min	25	Rebelo <i>et al.</i> , (2018)
mcr₂	F - CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT R - TCTAGCCCACACAAGCATACC	715	94°C 15min	94°C 30sec	58°C 1:30min	72°C 1min	72°C 10min	25	Rebelo <i>et al.</i> , (2018)
mcr₃	F - AATAAAAATTGTTCCGCTTATG R - AATGGAGATCCCCGTTTTT	929	94°C 15min	94°C 30sec	58°C 1:30min	72°C 1min	72°C 10min	25	Rebelo <i>et al.</i> , (2018)
mcr₄	F - TCACTTTCATCACTGCGTTG R - TTGGTCCATGACTACCAATG	1116	94°C 15min	94°C 30sec	58°C 1:30min	72°C 1min	72°C 10min	25	Rebelo <i>et al.</i> , (2018)
ndm	F- GGTGGCGCATCTGGTTTTTC R - CGGAATGGCTCATCACGATC	621	94°C 10min	94°C 30sec	52°C 40sec	72°C 50sec	72°C 5min	36	Poirel <i>et al.</i> , (2011)

Tabela 3. Genes de resistência amplificados por PCR em *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. isoladas do sítio cirúrgico de cães, das mãos de cirurgiões e da sala de operação em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil.

Genes	Sequência de nucleotídeo (5' – 3')	Tamanho (pb)	Etapas da amplificação						Referência
			Denaturação inicial	Denaturação	Anelamento	Extensão	Elongamento	Ciclos	
tet(M)	F-AGTGGAGCGATTACAGAA R-CATATGTCCTGGCGTGTCTA	158	95°C 3min	94°C 1min	55°C 1min	72°C 1min	72°C 7min	30	Kumar <i>et al.</i> , (2010)
ermA	F-AAGCGGTAAACCCCTCTGA R-TTCGCAAATCCCTTCTCAAC	190	95°C 3min	94°C 1min	55°C 1min	72°C 1min	72°C 7min	30	Kumar <i>et al.</i> , (2010)
aacA-aphD	F-TAATCCAAGAGCAATAAGGGC R-GCCACACTATCATAACCACTA	227	95°C 3min	94°C 1min	55°C 1min	72°C 1min	72°C 7min	30	Kumar <i>et al.</i> , (2010)
blaZ	F-ACTTCAACACCTGCTGCTTTC R-TGACCACTTTTATCAGCAACC	173	95°C 3min	94°C 1min	55°C 1min	72°C 1min	72°C 7min	30	Duran <i>et al.</i> , (2012)
mecA*	F-ACTGCTATCCACCCTCAAAC R-CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	163	95°C 3min	94°C 1min	55°C 1min	72°C 1min	72°C 7min	30	Mehrotra <i>et al.</i> , (2000)

*apenas para *Staphylococcus* spp.

Os genes *tet(M)* (Kumar *et al.*, 2010), *aacA-aphD* (Kumar *et al.*, 2010), *ermA* (Kumar *et al.*, 2010) e *blaZ* (Duran *et al.*, 2012) foram pesquisados nos isolados de *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp., enquanto *mecA* (Mehtora *et al.*, 2000) foi exclusivamente investigado em *Staphylococcus* spp. Nos isolados de *E. coli*, os seguintes genes foram investigados: *bla_{TEM-1}* (Essack *et al.*, 2001), *bla_{SHV}* (Spanu *et al.*, 2002), *bla_{SHV-1}* (Essack *et al.*, 2001), *bla_{CTX-M-1, 3 e 15}* (Dallenne *et al.*, 2010), *bla_{CTX-M-2}* (Dallenne *et al.*, 2010), *bla_{CMY-2}* (Kojima *et al.*, 2005), *mcr₁* (Rebelo *et al.*, 2018), *mcr₂* (Rebelo *et al.*, 2018), *mcr₃* (Rebelo *et al.*, 2018), *mcr₄* (Rebelo *et al.*, 2018) e *ndm* (Poirel *et al.*, 2011).

O protocolo de PCR seguiu o método descrito por China *et al.* (1996), com pequenas modificações. Resumidamente, uma alíquota de DNA (2 µL) foi adicionada a uma mistura contendo 0,4 µL de dNTP (2 mM), 2 µL de solução tampão 10X (200 mM Tris-HCl; 500 mM KCl; 20 mM MgCl₂ [pH 8,5]), 0,8 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase e 1 µL de cada primer (10 pmol), “forward” e “reverse”. O volume final de 20 µL foi completado com água ultrapura estéril.

Uma alíquota de 5 µL de tampão de carregamento com corante (0,25% azul de bromofenol em 50% de glicerol) foi adicionada ao produto da PCR. Um marcador molecular (100 pb ou 1000 pb) foi aplicado em gel de agarose a 1,5% contendo SYBR® Safe DNA Gel Stain 10X (Thermo Fisher Scientific, Brasil). A eletroforese foi realizada em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) a 120V, durante 40 a 60 minutos.

5.7.3 Genotipagem bacteriana

O DNA genômico de todos os isolados de *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. foi digerido com a enzima *SmaI*, enquanto os isolados de *E. coli* e *Salmonella* spp. foram digeridos com *XbaI*. Posteriormente, os fragmentos foram separados pela técnica de PFGE seguindo o protocolo padronizado do Centers for Disease Control (CDC) (Ribot *et al.*, 2006).

Os tempos de alternância de pulso para *E. coli* foram de 2,2 s no tempo inicial e 54,2 s no tempo final, com um gradiente de 6 V cm⁻¹ e ângulo de 120°, a 14 °C por 21 horas. Para *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp., os tempos de alternância foram de 5,0 s no tempo inicial e 40,0 s no tempo final, com o mesmo gradiente e ângulo, a 14 °C por 19 horas.

O marcador de tamanho universal *Salmonella* sorotipo Braenderup H9812 foi utilizado em todos os géis (Hunter *et al.*, 2005).

5.7.4 Análise de dados

Os dados gerados foram submetidos à análise estatística descritiva utilizando a planilha do WPS Office Spreadsheet© versão 5.7.1 (Kingsoft Office Corporation, China) e expressos em porcentagens.

A frequência de genes de resistência (FR) foi calculada na planilha do WPS Office de acordo com a fórmula:

$$FR(\%) = \left(\frac{\text{número de isolados positivos para um gene específico}}{\text{número total de isolados testados}} \right) \times 100$$

O teste qui-quadrado foi aplicado utilizando o software R 4.3.3© (R Foundation for Statistical Computing, Áustria) para comparar as taxas de resistência bacteriana entre isolados obtidos de diferentes fontes (dentro da mesma espécie) ou entre diferentes espécies. Foi adotado um nível de significância de 0,05.

As impressões genéticas de DNA foram analisadas com o software BioNumerics 7.1 (Applied Maths NV, bioMérieux, Bélgica), e a similaridade dos fragmentos de PFGE obtidos foi comparada usando o coeficiente de Dice, com uma tolerância e otimização de 1%. O dendrograma foi gerado utilizando o método de agrupamento UPGMA. Um corte de similaridade de 90% foi aplicado no PFGE para considerar isolados como geneticamente relacionados.

A razão de diversidade (DR) foi calculada na planilha do WPS Office de acordo com a fórmula:

$$DR(\%) = \left(\frac{\text{número de padrões de bandas no PFGE}}{\text{número total de isolados}} \right) \times 100$$

6 RESULTADOS

6.1 Classificação das espécies bacterianas

A identificação e o escore obtido na análise por MALDI-TOF para os isolados analisados encontram-se descritos nas Tabelas 4-6.

Tabela 4. Identificação por MALDI-TOF MS de espécies de *Staphylococcus* obtidas do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.

Key	Padrão de correspondência (Best Match)	ID NCBI	Rank (qualidade)	Escore
03	<i>Staphylococcus xylosus</i> FI FLR	<u>1288</u>	1 (+++)	2,15
04	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 10547 CHB	<u>1282</u>	1 (+)	1,92
05	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 10024 CHB	<u>1283</u>	1 (+++)	2,06
12	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> DSM 20228 BRB	<u>1283</u>	1 (+)	1,79
17	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 10024 CHB	<u>1283</u>	1 (+++)	2,08
20	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> LMG 9079	<u>283734</u>	1 (+++)	2,11
22	<i>Staphylococcus hominis</i> CICC 23976 CICC	<u>1290</u>	1 (+++)	2,12
24	<i>Staphylococcus warneri</i> DSM 20316T DSM	<u>1292</u>	1 (+++)	2,07
26	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> Mb18803_2 CHB	<u>1283</u>	1 (+)	1,86
27	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> CCUG 32915 CCUG	<u>283734</u>	1 (+)	1,99
29	<i>Staphylococcus sciuri</i> DSM 15613T DSM	<u>1296</u>	1 (+)	1,97
33	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> Mb18803_2 CHB	<u>1283</u>	1 (+)	1,78
36	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> CCUG 32915 CCUG	<u>283734</u>	1 (+++)	2,06
38	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 10024 CHB	<u>1283</u>	1 (+)	1,98
57	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NY_1666 MCW	<u>1282</u>	1 (+)	1,97
62	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NY_1717 MCW	<u>1282</u>	1 (+++)	2,04
64	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NY_1717 MCW	<u>1282</u>	1 (+)	1,99
68	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> CCUG 32915 CCUG	<u>283734</u>	1 (+++)	2,22
78	<i>Staphylococcus schleiferi</i> DSM 4809 DSM	<u>1295</u>	1 (+)	1,81
82	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> LMG 9079 LMG	<u>283734</u>	1 (+)	1,94
83	<i>Staphylococcus capitis</i> DSM 20325 DSM	<u>29388</u>	1 (+)	1,87
85	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> CCUG 32915 CCUG	<u>283734</u>	1 (+)	1,99
86	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> 472 RLT	<u>283734</u>	1 (+)	1,97
87	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> CCUG 32915 CCUG	<u>283734</u>	1 (+++)	2,01
88	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 10024 CHB	<u>1283</u>	1 (+++)	2,13
90	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> 472 RLT	<u>283734</u>	1 (+)	1,81
91	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> CCUG 32915 CCUG	<u>283734</u>	1 (+++)	2,08
100	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> CCUG 32915 CCUG	<u>283734</u>	1 (+++)	2,14
101	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> LMG 9079 LMG	<u>283734</u>	1 (+++)	2
103	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> LMG 9079 LMG	<u>283734</u>	1 (+++)	2,1
112	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990T THL	<u>1282</u>	1 (+)	1,97
113	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> LMG 9079 LMG	<u>283734</u>	1 (+++)	2,08
114	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NY_1717 MCW	<u>1282</u>	1 (+++)	2,00
115	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 10024 CHB	<u>1283</u>	1 (+++)	2,07
116	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> LMG 9079 LMG	<u>283734</u>	1 (+++)	2,26
117	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> CCUG 32915 CCUG	<u>283734</u>	1 (+++)	2,05
118	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NY_1666 MCW	<u>1282</u>	1 (+)	1,78
126	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 10024 CHB	<u>1283</u>	1 (+)	1,96
127	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> CCUG 32915 CCUG	<u>283734</u>	1 (+++)	2,01
128	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> 472 RLT	<u>283734</u>	1 (+++)	2,09
129	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> CCUG 32915 CCUG	<u>283734</u>	1 (+)	1,99
130	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> LMG 9079 LMG	<u>283734</u>	1 (+)	1,87
132	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> LMG 9079 LMG	<u>283734</u>	1 (+++)	2,22
133	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> CCUG 50530 CCUG	<u>283734</u>	1 (+++)	2,11
134	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> CCUG 50530 CCUG	<u>283734</u>	1 (+)	1,857
137	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> CCUG 32915 CCUG	<u>283734</u>	1 (+++)	2
142	<i>Staphylococcus schleiferi</i> DSM 4807T DSM	<u>74707</u>	1 (++)	2,09
150	<i>Staphylococcus lutrae</i> DSM 10246 DSM	<u>155085</u>	1 (+)	1,94

Legenda: MALDI-TOF MS = Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry.

Tabela 5. Identificação por MALDI-TOF MS de espécies de *Enterococcus* obtidas do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.

Key	Padrão de correspondência (Best Match)	ID NCBI	Rank (qualidade)	Escore
09	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 17050 DSM	<u>1352</u>	1 (++)	2,25
10	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	<u>1352</u>	1 (+++)	2,46
11	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	<u>1352</u>	1 (+++)	2,40
15	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	<u>1352</u>	1 (+++)	2,38
16	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	<u>1352</u>	1 (+++)	2,35
19	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	<u>1352</u>	1 (+++)	2,43
25	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	<u>1352</u>	1 (++)	2,19
34	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 2146 DSM	<u>1352</u>	1 (++)	2,26
42	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	<u>1352</u>	1 (+++)	2,42
50	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 2146 DSM	<u>1352</u>	1 (++)	2,26
60	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	<u>1352</u>	1 (+++)	2,43
61	<i>Enterococcus faecium</i> 11037 CHB	<u>1352</u>	1 (+++)	2,45
65	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	<u>1352</u>	1 (+++)	2,47
66	<i>Enterococcus faecium</i> 11037 CHB	<u>1352</u>	1 (+)	1,92
98	<i>Enterococcus faecium</i> VRE_PX_16086218 MLD	<u>1352</u>	1 (++)	2,05
99	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 7080 THL	<u>1351</u>	1 (++)	2,06
102	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 THL	<u>1351</u>	1 (++)	2,06
104	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 CHB	<u>1351</u>	1 (++)	2,01
108	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	<u>1351</u>	1 (++)	2,05

Legenda: MALDI-TOF MS = Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry.

Tabela 6. Identificação por MALDI-TOF MS de *Escherichia coli* obtidas do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.

Key	Padrão de correspondência (Best Match)	ID NCBI	Rank (qualidade)	Escore
69	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 THL	<u>562</u>	1 (+++)	2,34
73	<i>Escherichia coli</i> MB11464_1 CHB	<u>562</u>	1 (+++)	2,39
74	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 THL	<u>562</u>	1 (+++)	2,42
121	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 CHB	<u>562</u>	1 (+)	1,95
122	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 THL	<u>562</u>	1 (++)	2,06
123	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 THL	<u>562</u>	1 (++)	2,22
141	<i>Escherichia coli</i> MB11464_1 CHB	<u>562</u>	1 (+)	1,75
147	<i>Escherichia coli</i> MB11464_1 CHB	<u>562</u>	1 (+)	1,89

Legenda: MALDI-TOF MS = Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry.

Entre as espécies bacterianas analisadas, dentro de cada espécie, *S. pseudintermedius* (83,33% [20/24]), *E. coli* (62,50% [5/8]) e *Enterococcus spp.* (52,63% [10/19]) foram isolados com maior frequência da pele dos cães, enquanto espécies de *Staphylococcus spp.* coagulase-negativa (CoNS; 62,50% [15/24]) foram mais frequentemente isolados do ambiente da sala operatória (Figura 2). Em relação às espécies estafilocócicas (Figura 3), a mais frequente foi *S. pseudintermedius* (50% [24/48]), seguida por *S. haemolyticus* (19% [9/48]) e *S. epidermidis* (15% [7/48]). Entre

as espécies enterocócicas, *Enterococcus faecium* (89,47% [17/19]) foi a mais frequente, seguida por *E. faecalis* (10,53% [2/19]).

Ao comparar a ocorrência entre os grupos, *S. pseudintermedius* foram mais frequentes no G2 (70% [21/30]) do que no G1 (16,67% [3/18]), enquanto CoNS foram mais frequentes no G1 (83,33% [15/18]) em comparação com o G2 (30% [9/30]). Além disso, *Enterococcus spp.* foram mais prevalentes no G1 (68,42% [13/19]), enquanto isolados de *E. coli* foram identificados apenas no G2 (Figura 4).

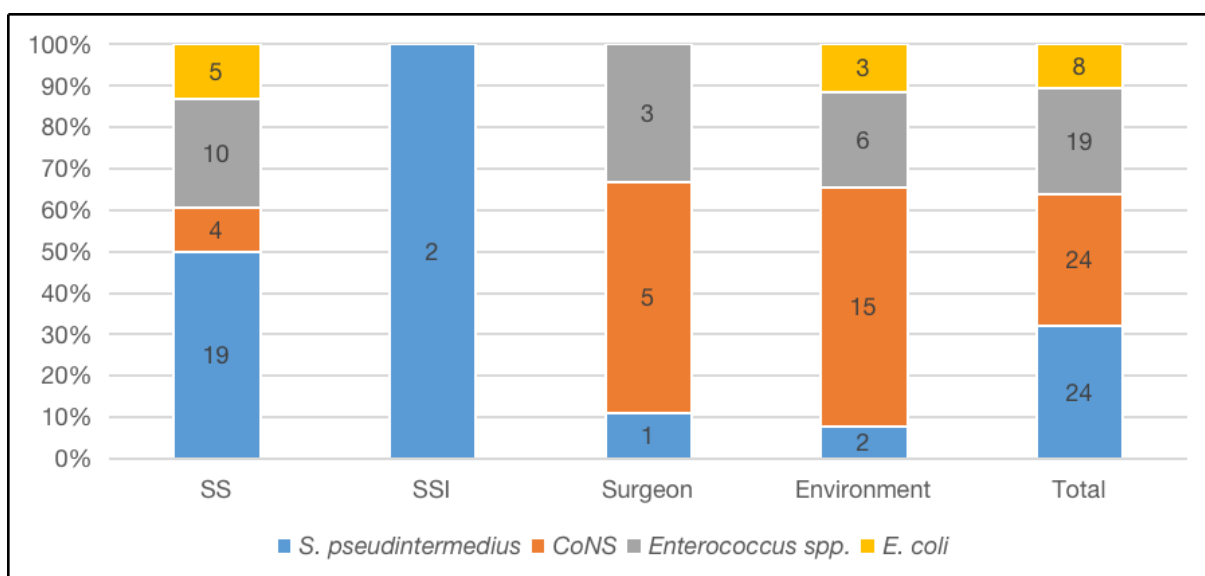


Figura 2. Frequência de isolados de *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.* e *E. coli* obtidos do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.

Legenda: CoNS = *Staphylococcus spp.* coagulase-negativa; SS = sítio cirúrgico superficial de cães; SSI = infecção do sítio cirúrgico; Surgeon = cirurgião; Environment = ambiente.

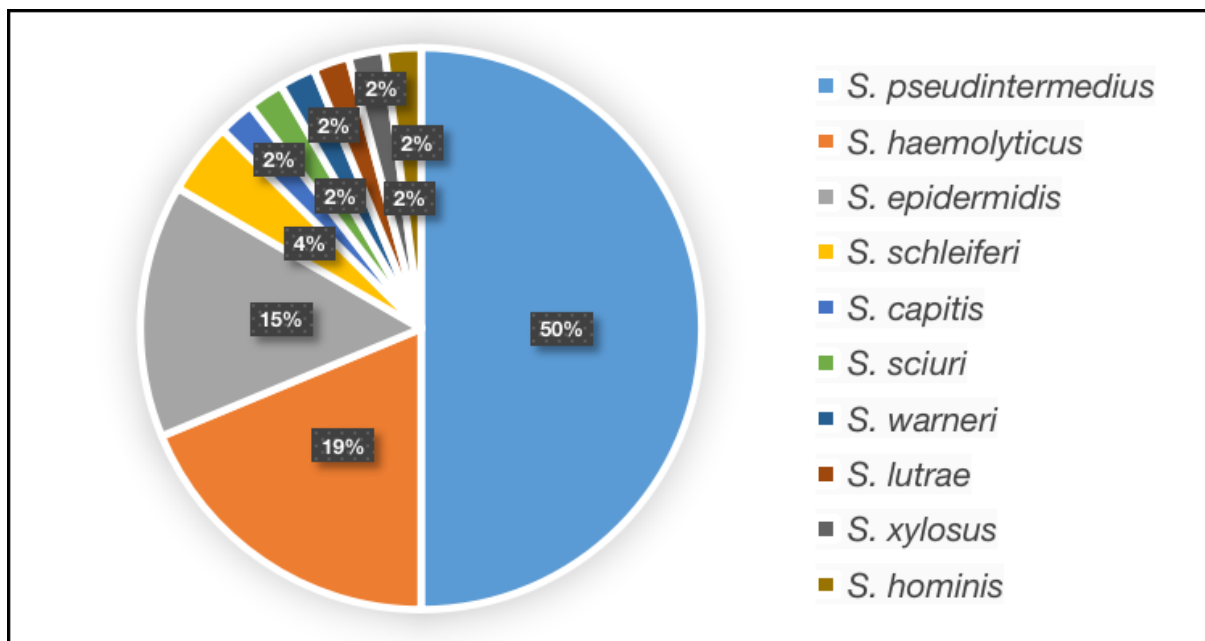


Figura 3. Distribuição percentual de isolados de espécies de *Staphylococcus* obtidos do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.

Dois dos 10 cães no G2 (20%) desenvolveram ISC nos 30 dias após a intervenção. Essas infecções foram causadas por espécies mistas envolvendo *S. pseudintermedius*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como *S. pseudintermedius* e *Enterobacter spp.* Nenhum animal no G1 apresentou ISC nos 30 dias após o procedimento.

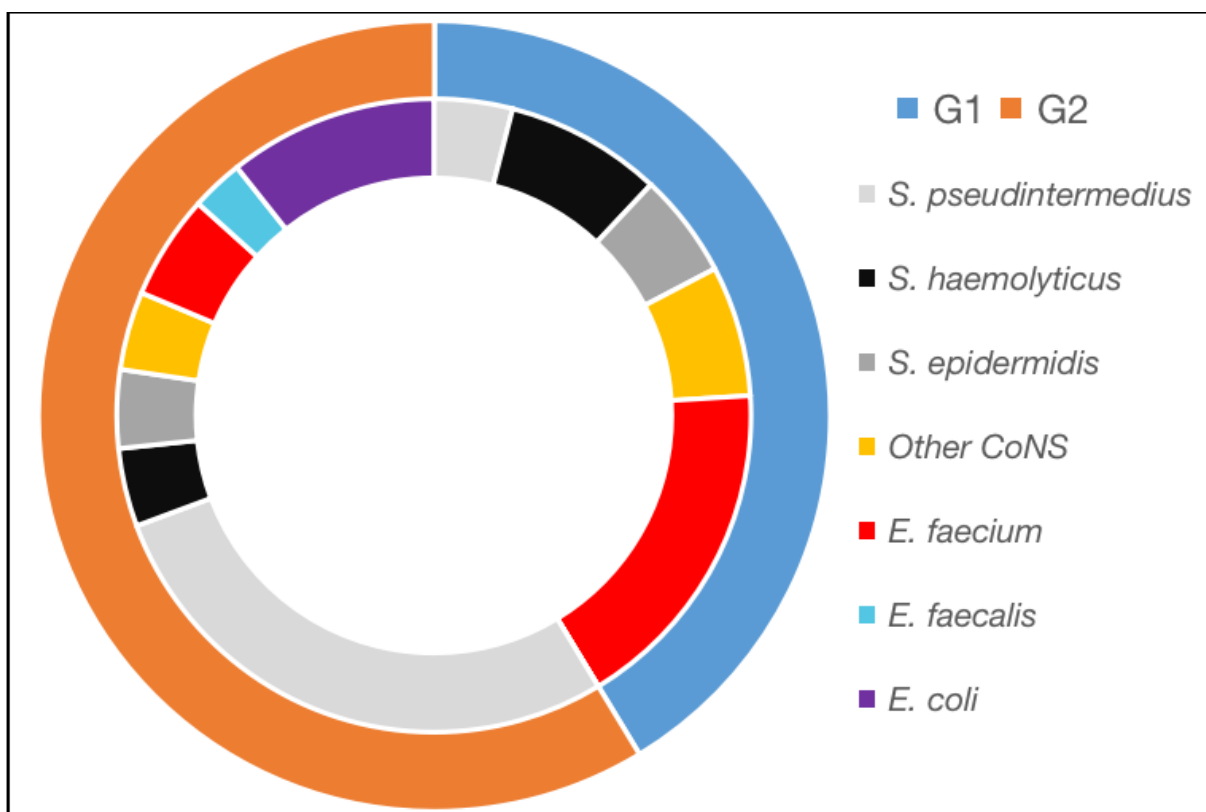


Figura 4. Distribuição percentual de espécies de *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Escherichia coli* obtidas do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas/limpas-contaminadas (G1) e contaminadas (G2) em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.

O anel externo diferencia os dois grupos: cirurgias limpas/limpas-contaminadas (G1, azul) e cirurgias contaminadas (G2, laranja), enquanto o anel interno representa as espécies bacterianas isoladas no G1 (direita) e G2 (esquerda).

Legenda: G1 = cirurgia limpa/limpa-contaminada; G2 = cirurgia contaminada; CoNS = *Staphylococcus* spp. coagulase-negativa.

6.2 Genes de resistência

Em termos da presença de genes de resistência, *blaZ* foi o mais frequentemente detectado de forma geral (Figura 5).

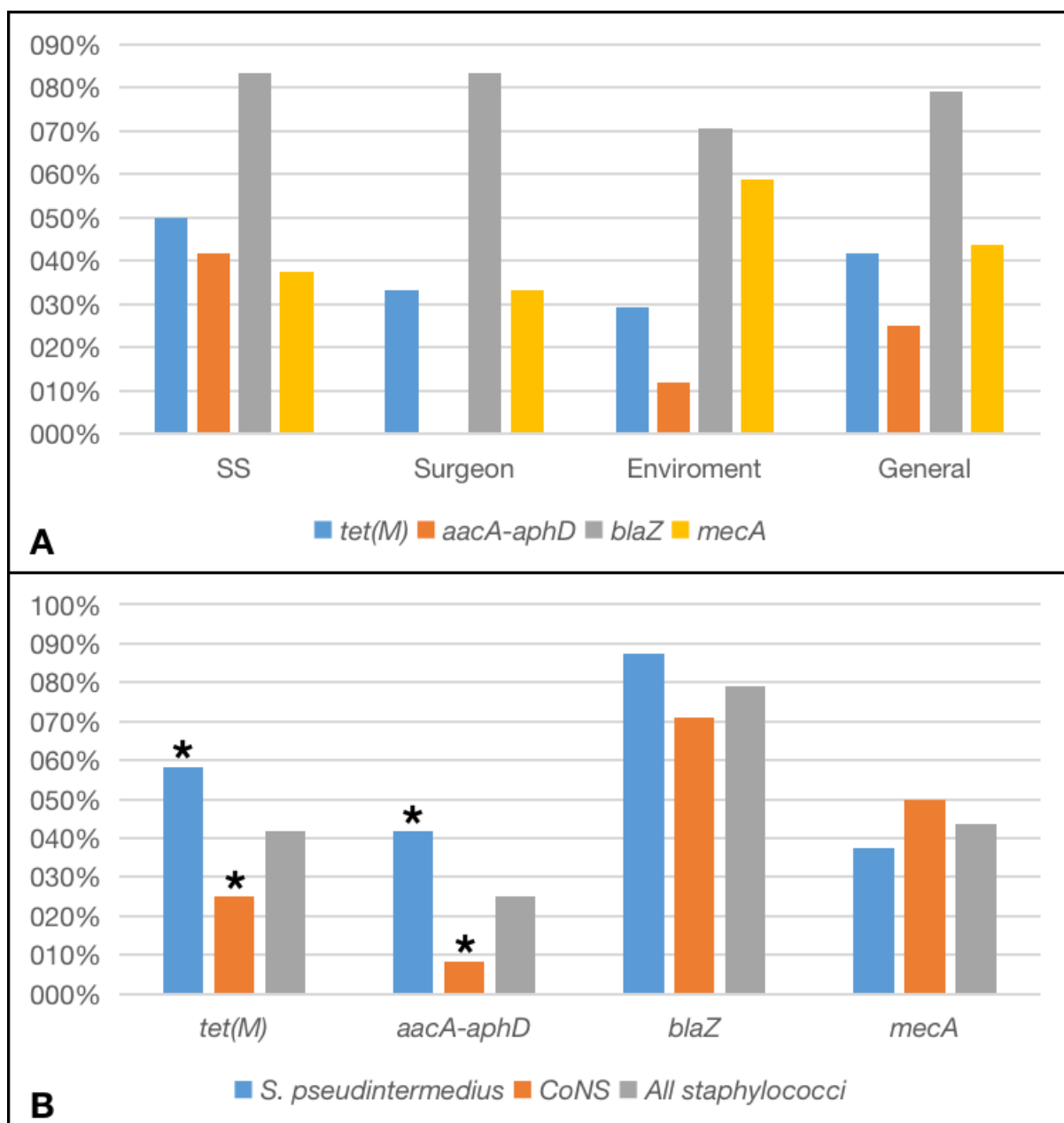


Figura 5. Frequência de detecção dos genes de resistência pesquisados em *Staphylococcus* sp. por fonte de coleta (A) e em *S. pseudintermedius* e espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa (B) obtidas do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.

*Uma diferença estatística foi observada ao comparar as taxas de genes de resistência positivos entre os isolados de *Staphylococcus* spp., utilizando o teste qui-quadrado, com um nível de significância definido em 0,05 e análise conduzida no software R 4.3.3.
 Legenda: CoNS = *Staphylococcus* spp. coagulase-negativa; SS = sítio cirúrgico superficial de cães; Surgeon = cirurgião; Environment = ambiente.

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na frequência de genes de resistência (FR) entre os isolados obtidos de diferentes fontes ($p > 0,05$), conforme mostrado na Tabela 7.

Tabela 7. Frequência de detecção dos genes de resistência pesquisados em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.

Fonte	<i>tet(M)</i>		<i>aacA-aphD</i>		<i>blaZ</i>		<i>mecA</i>	
	N	%	N	%	N	%	N	%
SS (n=25)	12	50,00% ^a	10	41,67% ^a	20	83,33% ^a	9	37,50% ^a
Cirurgião (n=6)	2	33,33% ^a	0	0,00% ^a	5	83,33% ^a	2	33,33% ^a
Ambiente (n=17)	5	29,41% ^a	2	11,76% ^a	12	70,59% ^a	10	58,82% ^a

Grupos seguidos pelas mesmas letras não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparados pelo teste qui-quadrado, com limiar de significância estabelecido em 0,05 e análise realizada com o software R 4.3.3.

Legenda: SS = sítio superficial de cães.

Entre os isolados de *Staphylococcus* spp. (Tabela 8), *blaZ* apresentou a maior ocorrência (79,17% [38/48]), seguido por *mecA* (43,75% [21/48]), *tet(M)* (41,67% [20/48]) e *aacA-aphD* (25% [12/48]). CoNS (50% [12/24]) exibiram frequência maior de isolados positivos para *mecA* em comparação com *S. pseudintermedius* (37,50% [9/24]), embora nenhuma diferença estatística tenha sido observada entre as taxas ($p = 0,5606$). No entanto, para os genes *tet(M)* e *aacA-aphD*, *S. pseudintermedius* apresentou uma maior proporção ($p = 0,0404$ e $p = 0,0196$, respectivamente) de isolados positivos (58,33% [14/24] e 41,67% [10/24], respectivamente) em comparação com CoNS (25% [6/24] e 8,33% [2/24], respectivamente).

Tabela 8. Frequência de detecção dos genes de resistência pesquisados em isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* e espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa obtidos do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.

Espécie	<i>tet(M)</i>		<i>aacA-aphD</i>		<i>blaZ</i>		<i>mecA</i>	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>S. pseudintermedius</i> (n=24)	14	58,33%*	10	41,67%*	21	87,50%	9	37,50%
CoNS (n=24)	6	25,00%*	2	8,33%*	17	70,83%	12	50,00%
<i>p-value</i>	0,04042		0,01963		0,2863		0,5606	

*Valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre espécies de *Staphylococcus* spp., comparados pelo teste qui-quadrado, com limiar de significância estabelecido em 0,05 e análise realizada com o software R 4.3.3. Valores significativamente diferentes estão destacados em negrito.

Legenda: CoNS = *Staphylococcus* spp. coagulase-negativa; SS = sítio superficial de cães.

Os resultados fenotípicos e genotípicos obtidos estão resumidos nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Resumo da resistência fenotípica e genotípica observada em isolados de *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* obtidos do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias limpas e limpas-contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.

Key	Procedimento	Fonte	Espécie	Resistência fenotípica ¹	Genes de resistência
3	P3	Env	<i>Staphylococcus xylosus</i>	cli*; pen; eno; lev; cip; nor; tet; MDR	<i>mecA</i>
4	P3	Env	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	azi; ery; pen; cfo; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; MLSb; MDR	<i>tet; gen; blaZ; mecA</i>
5	P4	Env	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	ery*; pen; cfo; tet; sut; MDR	<i>blaZ</i>
150	P4	Surg	<i>Staphylococcus lutrae</i>	azi; ery; pen; gen; MDR	None
9	P5	SS	<i>Enterococcus faecium</i>	ery; pen; tet; MDR	<i>tet</i>
10	P5	SS	<i>Enterococcus faecium</i>	pen; tet	<i>tet</i>
11	P6	Env	<i>Enterococcus faecium</i>	ery; pen	<i>tet</i>
12	P6	Env	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	azi; ery; pen; cfo; tet; MLSb; MDR	None
15	P6	SS	<i>Enterococcus faecium</i>	ery*; pen; tet	<i>tet</i>
16	P7	Env	<i>Enterococcus faecium</i>	ery; pen	<i>tet</i>
17	P7	Env	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	pen; cfo; eno; lev; cip; nor; tet*; MDR	<i>blaZ; mecA</i>
19	P7	Env	<i>Enterococcus faecium</i>	ery; tet*	<i>tet; blaZ</i>

Continua na página seguinte (...)

(...) Continuação da Tabela 9

Key	Procedimento	Fonte	Espécie	Resistência fenotípica ¹	Genes de resistência
20	P8	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	pen; eno; eno; lev; cip; nor; sut; MDR	<i>tet; blaZ</i>
22	P10	Env	<i>Staphylococcus hominis</i>	azi; ery; cli; pen; cfo; MDR	<i>blaZ; mecA</i>
24	P10	Surg	<i>Staphylococcus warneri</i>	pen; cfo	<i>tet; blaZ</i>
25	P11	Env	<i>Enterococcus faecium</i>	ery	<i>tet</i>
26	P11	Env	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	azi; ery; cli; pen; cfo; eno; lev; cip; nor; gen; sut; MDR	<i>tet; blaZ; mecA</i>
27	P12	Env	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	ery*; sut	<i>blaZ</i>
29	P13	Env	<i>Staphylococcus sciuri</i>	ery*; cli; pen; cfo; eno*; sut; MDR	Nenhum
33	P14	Env	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	azi; ery; cli; pen; cfo; gen; tet; sut; MDR	<i>tet; mecA</i>
34	P14	Env	<i>Enterococcus faecium</i>	ery	<i>tet</i>
36	P14	Surg	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	pen; tet	<i>tet; blaZ</i>
38	P15	Env	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	azi; ery; cli*; pen; cfo; eno; lev; cip; nor; gen; sut; MDR	<i>blaZ; mecA</i>
42	P15	SS	<i>Enterococcus faecium</i>	ery*; tet; clo*	<i>tet</i>
50	P17	Env	<i>Enterococcus faecium</i>	ery; clo*	<i>blaZ</i>
57	P19	Env	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	azi; ery; cli; pen; cfo; eno; eno; lev; cip; nor; tet; sut; MDR	<i>tet; blaZ</i>
60	P19	SS	<i>Enterococcus faecium</i>	ery; pen; amp; tet; MDR	<i>tet</i>
61	P19	SS	<i>Enterococcus faecium</i>	ery; pen; amp; tet*; MDR	<i>tet</i>
62	P20	Env	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	azi; ery; pen; cfo; sut*; MDR	<i>tet; blaZ; mecA</i>
64	P20	Surg	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	azi; ery; cli; pen; cfo; eno; lev; cip; nor*; tet; sut; clo; MDR	<i>blaZ; mecA</i>
65	P20	SS	<i>Enterococcus faecium</i>	ery*; pen; tet	<i>tet</i>

*Sensível aumentando a exposição.

¹Resultados fenotípicos previamente publicados por Menezes et al. (2022).

Legenda: SS = sítio superficial de cães; SSI = infecção do sítio cirúrgico; Env = ambiente; Surg = cirurgião; azi = azitromicina; cfo = cefoxitina; cli = clindamicina; clo = cloranfenicol; eno = enrofloxacina; ery = eritromicina; gen = gentamicina; lev = levofloxacina; nor = norfloxacina; oxa = oxacilina; pen = penicilina; sut = sulfametoxazol-trimetoprima; tet = tetraciclina; MDR = resistência à múltiplas drogas; MLSb = fenótipo de resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B.

Tabela 10. Resumo da resistência fenotípica e genotípica observada em isolados de *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* obtidos do sítio cirúrgico superficial de cães, mãos do cirurgião e sala operatória durante o período intraoperatório em cirurgias contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.

Key	Procedimento	Fonte	Espécie	Resistência fenotípica ¹	Genes de resistência
66	P1	Env	<i>Enterococcus faecium</i>	pen; tet	Nenhum
68	P1	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; ery*; cli; pen; oxa; tet; MDR	<i>blaZ</i>
69	P1	SS	<i>Escherichia coli</i>	cro; eno; lev; cip; nor; sut; MDR	Nenhum
73	P1	SS	<i>Escherichia coli</i>	eno; lev; cip; nor; gen*; ami; tet; MDR	Nenhum
74	P1	SS	<i>Escherichia coli</i>	eno; lev; cip; nor; gen*; ami; tet; MDR	Nenhum
78	P1	SS	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	pen; eno*; nor*, tet	Nenhum
141	P1	SS	<i>Escherichia coli</i>	eno; lev; cip; nor; gen*; ami; tet; MDR	Nenhum
142	P1	SS	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	pen; eno*; nor*, tet	Nenhum
82	P2	Env	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; ery; cli; pen; oxa; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; clo; MDR	<i>gen; mecA</i>
83	P2	Surg	<i>Staphylococcus capitis</i>	azi; ery; pen	<i>blaZ</i>
85	P2	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; ery; cli; pen; oxa; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; clo; MDR	<i>gen; blaZ; mecA</i>
86	P2	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; ery; cli; pen; oxa; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; clo; MDR	<i>gen; blaZ; mecA</i>
87	P2	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; ery; cli; pen; oxa; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; clo; MDR	<i>gen; blaZ; mecA</i>
88	P2	SS	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	azi; ery; pen; cfo; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; MDR	<i>gen; blaZ; mecA</i>
90	P2	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; ery; cli; pen; oxa; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; clo; MDR	<i>gen; blaZ; mecA</i>
91	P2	SSI	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; ery; cli; oxa; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; clo; MDR	<i>gen; blaZ; mecA</i>
98	P3	Surg	<i>Enterococcus faecium</i>	ery; pen; amp; tet; MDR	<i>tet</i>
99	P3	Surg	<i>Enterococcus faecium</i>	ery; pen; tet; clo*; MDR	<i>tet</i>
100	P3	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; ery; cli; pen; oxa; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; clo; MDR	<i>tet; gen; blaZ; mecA</i>
101	P3	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; ery; cli; pen; oxa; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; MDR	<i>tet; gen; blaZ; mecA</i>
102	P3	SS	<i>Enterococcus faecalis</i>	ery; pen; amp; tet; MDR	Nenhum
103	P3	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; ery; cli; pen; oxa; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; MDR	<i>gen; blaZ; mecA</i>
104	P3	SS	<i>Enterococcus faecalis</i>	ery; amp; tet; clo; MDR	Nenhum

Continua na página seguinte (...)

(...) Continuação da Tabela 10

Key	Procedimento	Fonte	Espécie	Resistência fenotípica ¹	Genes de resistência
108	P4	SS	<i>Enterococcus faecium</i>	ery; pen; tet; MDR	<i>tet</i>
112	P6	Env	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	azi; ery; pen; cfo; MDR	<i>blaZ; mecA</i>
113	P6	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	cli; pen; eno*; sut; MDR	<i>blaZ</i>
114	P7	Env	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	azi; ery; pen; eno; lev; cip; nor; tet; sut; clo*; MDR	<i>blaZ</i>
115	P7	Surg	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	azi; ery; cli; pen; cfo; cip; nor; clo; MDR	<i>blaZ; mecA</i>
116	P7	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; ery; cli; oxa; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; clo; MDR	<i>tet</i>
117	P7	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; ery; cli; oxa; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; clo; MDR	<i>tet</i>
118	P8	Env	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	pen	<i>blaZ</i>
121	P10	Env	<i>Escherichia coli</i>	amp; cfz*; cfo*; cro; ipm; eno; lev; cip; nor; gen; ami; tet; sut; clo; MDR	Nenhum
122	P10	Env	<i>Escherichia coli</i>	amp; ipm; eno; lev; gen; ami; sut; clo; MDR	Nenhum
123	P10	Env	<i>Escherichia coli</i>	amp; ipm; eno; lev; gen; ami; sut; clo; MDR	Nenhum
126	P10	SS	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	azi*; ery*; cli; pen; cfo; eno*; tet; MDR	<i>blaZ</i>
127	P10	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; ery; cli; pen; oxa; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; clo; MDR	<i>tet; blaZ</i>
128	P10	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; pen; oxa; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; clo; MDR	<i>tet; blaZ</i>
129	P10	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	pen; oxa; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; clo; MDR	<i>tet; blaZ</i>
130	P10	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; ery; cli; pen; eno; lev; cip; nor; gen; tet; sut; MDR	<i>tet; blaZ</i>
132	P10	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; ery; cli; pen; oxa; gen*; tet; MDR	<i>tet; gen; blaZ</i>
133	P10	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	pen; eno*; tet	<i>tet; blaZ</i>
134	P10	SS	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	pen; eno*; tet	<i>tet; blaZ</i>
137	P10	SSI	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	azi; ery; cli; pen; oxa; sut; MDR	<i>tet; blaZ</i>
147	P10	SS	<i>Escherichia coli</i>	caz; ctx; ipm*; ami*	Nenhum

*Sensível aumentando a exposição.

¹Resultados fenotípicos previamente publicados por Menezes et al. (2022).

Legenda: SS = sítio superficial de cães; SSI = infecção do sítio cirúrgico; Env = ambiente; Surg = cirurgião; azi = azitromicina; cfo = cefoxitina; cli = clindamicina; clo = cloranfenicol; eno = enrofloxacin; ery = eritromicina; gen = gentamicina; lev = levofloxacin; nor = norfloxacin; oxa = oxacilina; pen = penicilina; sut = sulfametoxazol-trimetoprima; tet = tetraciclina; MDR = resistência à múltiplas drogas; MLSb = fenótipo de resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B.

Quatro dos 10 procedimentos (40%) dentro do G2 e sete dos 20 (35%) dentro do G1 apresentaram pelo menos um isolado de MRS.

6.3 Diversidade genética

Foram observados 24 perfis de bandas na análise de PFGE em isolados de CoNS. *Staphylococcus haemolyticus* e *S. epidermidis* apresentaram uma razão de diversidade (DR) de 100%. Quinze perfis de bandas de PFGE foram identificados em *S. pseudintermedius* (DR = 62,50% [15/24]), 4 em *E. coli* (DR = 50% [4/8]) e 7 em *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* (DR = 36,84% [7/19]).

Entre as espécies estafilocócicas, os isolados de CoNS exibiram maior diversidade em comparação com *S. pseudintermedius* (Figura 6). Isolados geneticamente relacionados de *S. pseudintermedius* provenientes de diferentes fontes foram identificados durante dois procedimentos (P2 e P10) no G2 (Figura 6A). Em contraste, nenhum isolado de *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* apresentou alto grau de similaridade ($\geq 90\%$) entre as três fontes distintas (Figura 6B e 6C). Três isolados foram obtidos de sítios cirúrgicos superficiais (SS) (*key*: 85, 87 e 90), 1 do ambiente da sala operatória (*key*: 82) e 1 isolado causador de ISC (*key*: 91) no P2. No P10, um isolado de SS (*key*: 130) foi geneticamente relacionado a um isolado causador de SSI (*key*: 137).

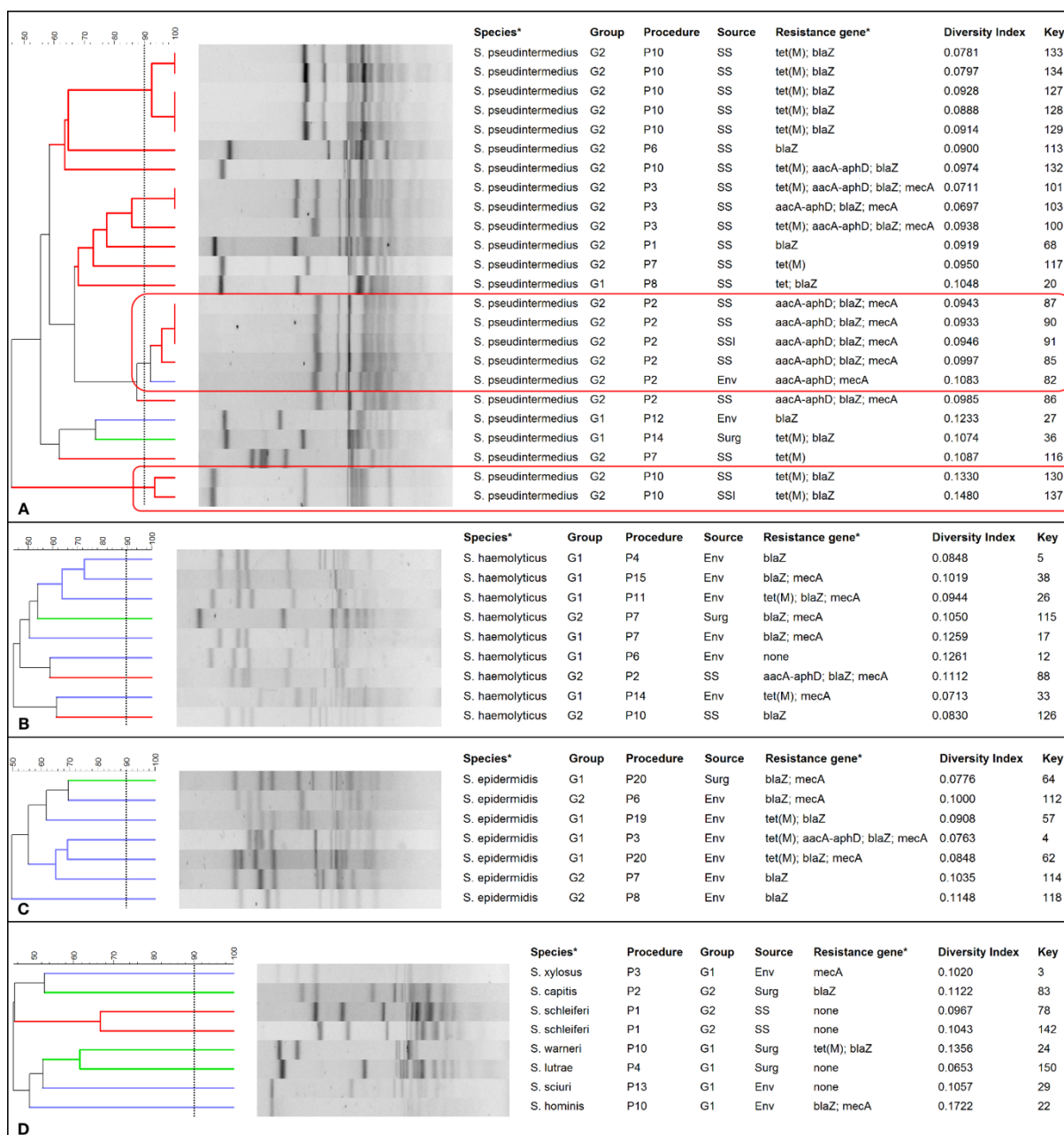


Figura 6. Dendrograma produzido pela comparação dos padrões de bandas em PFGE de *Staphylococcus pseudintermedius* (A), *S. haemolyticus* (B), *S. epidermidis* (C) e outras espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativa (D) isoladas do sítio cirúrgico superficial de cães (vermelho), mãos dos cirurgiões (verde) e sala operatória (azul) durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.

O dendrograma foi gerado utilizando o método de agrupamento UPGMA no software BioNumerics 7.1. O coeficiente de Dice e a otimização foram ajustados em 1%. Foi aplicado um ponto de corte de similaridade em PFGE de 90% (linha tracejada). Quadrados vermelhos destacam os isolados geneticamente relacionados.

*Nota: Os nomes de espécies e genes não estão em itálico devido às limitações do software. Legenda: G1 = cirurgia limpa/limpa-contaminada; G2 = cirurgia contaminada; SS = sítio cirúrgico superficial de cães; SSI = infecção do sítio cirúrgico; Env = ambiente; PFGE = Pulsed-Field Gel Electrophoresis; Surg = cirurgião.

Três episódios de *Enterococcus spp.* geneticamente relacionados foram identificados em diferentes procedimentos e pacientes distintos. Os isolados 42 e 61 (de P15 e P19), 102, 104 e 108 (de P3 e P4) e 9, 10 e 15 (de P5 e P6) foram obtidos do SS e exibiram alta similaridade (Figura 7A). Outro episódio foi identificado entre oito isolados obtidos do ambiente da sala operatória (11, 16, 34 e 66), de SS (60 e 65) e das mãos dos cirurgiões (98 e 99).

Apesar do número limitado de isolados de *E. coli* obtidos neste estudo, um episódio de isolados geneticamente relacionados foi encontrado (Figura 7B). No P10, três isolados obtidos do ambiente (key: 121, 122 e 123) foram similares a um isolado proveniente de SS (key: 147).

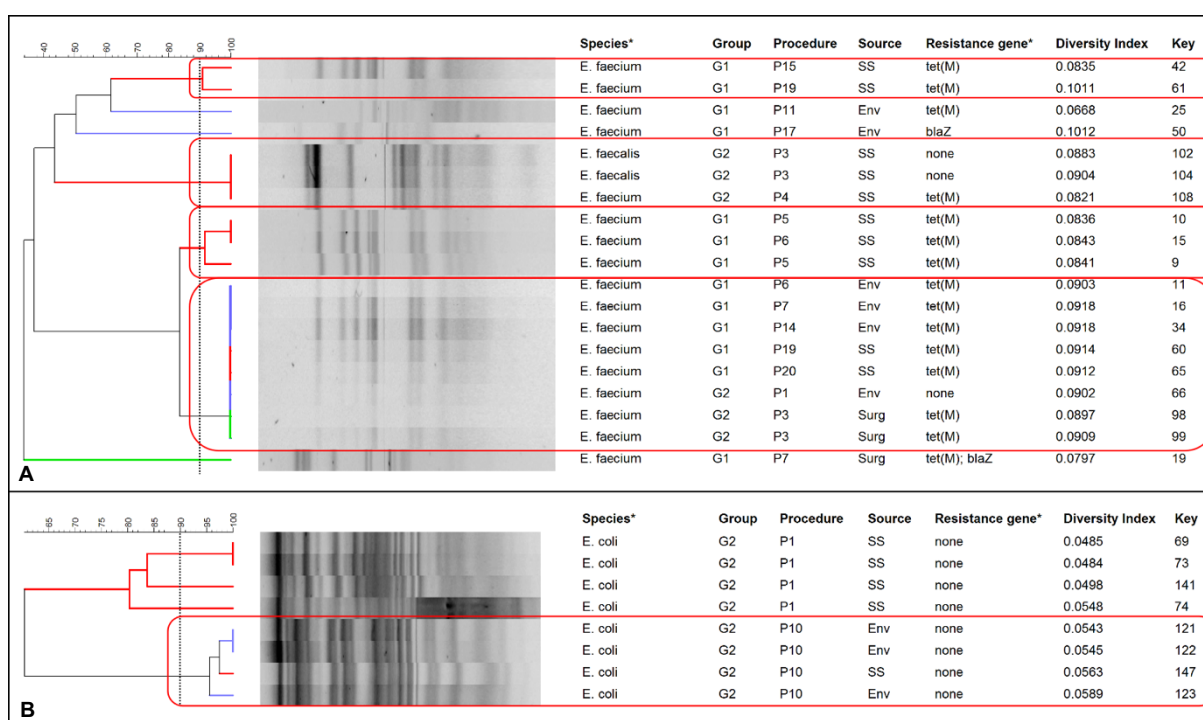


Figura 7. Dendrograma produzido pela comparação dos padrões de bandas em PFGE de isolados de *Enterococcus spp.* (A) e *Escherichia coli* (B) isoladas do sítio cirúrgico superficial de cães (vermelho), mãos dos cirurgiões (verde) e sala operatória (azul) durante o período intraoperatório em cirurgias limpas, limpas-contaminadas e contaminadas em um Hospital Veterinário Escola no estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2019.

O dendrograma foi gerado utilizando o método de agrupamento UPGMA no software BioNumerics 7.1. O coeficiente de Dice e a otimização foram ajustados em 1%. Foi aplicado um ponto de corte de similaridade em PFGE de 90% (linha tracejada). Quadrados vermelhos destacam os isolados geneticamente relacionados.

*Nota: Os nomes de espécies e genes não estão em itálico devido às limitações do software. Legenda: G1 = cirurgia limpa/limpa-contaminada; G2 = cirurgia contaminada; SS = sítio cirúrgico superficial de cães; SSI = infecção do sítio cirúrgico; Env = ambiente; PFGE = Pulsed-Field Gel Electrophoresis; Surg = cirurgião.

7 DISCUSSÃO

Este estudo epidemiológico transversal realizado em Hospital Escola Veterinário revela a prevalência de genes de resistência significativos identificados em *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *E. coli*, juntamente com seus perfis genotípicos. Esses isolados foram obtidos da pele de cães e cirurgiões, bem como do ambiente da sala operatória, durante o período intraoperatório de cirurgias limpas/limpas-contaminadas (G1) e contaminadas (G2) realizadas em um hospital veterinário de ensino no estado de São Paulo, Brasil.

Entre os isolados de *Staphylococcus* spp. analisados, espécies de CoNS foram mais prevalentes na sala operatória e nas mãos dos cirurgiões no G1, enquanto *S. pseudintermedius* foram mais frequentes no sítio cirúrgico de cães no G2. Entre os isolados de CoNS, observou-se maior diversidade, com *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* sendo as espécies mais prevalentes. O perfil genotípico por PFGE também revelou maior diversidade entre os isolados de CoNS em comparação aos de *S. pseudintermedius*.

S. pseudintermedius, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* são patógenos comuns que colonizam a pele e as membranas mucosas de cães e humanos (Chaudhary *et al.*, 2017; Shoen *et al.*, 2019). São patógenos oportunistas e causa comum de infecções associadas a cuidados de saúde, incluindo infecções de sítio cirúrgico (Chaudhary *et al.*, 2017; Shoen *et al.*, 2019). A colonização por *Staphylococcus* spp. resistentes à múltiplas drogas (MDR – “Multi-drug resistant”) ocorre como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de infecções graves (Walther *et al.*, 2017).

Neste estudo, apenas um isolado (12,5% [1/8]) de *S. pseudintermedius* foi obtido das mãos dos cirurgiões; no entanto, não foi geneticamente relacionado a outros isolados encontrados no ambiente ou na pele do cão, sugerindo colonização humana por essa cepa. O contato próximo entre humanos e animais de companhia tem aumentado, elevando a prevalência dessa espécie, particularmente entre profissionais veterinários (Lozano *et al.*, 2017; Feßler *et al.* 2018; Rodrigues *et al.*, 2018; Jin *et al.*, 2023; Moses *et al.*, 2023).

Isolados bacterianos geneticamente relacionados obtidas de diferentes fontes foram encontradas entre *S. pseudintermedius* em dois procedimentos do G2 (20%

[2/10]). Tal achado provavelmente se deve ao fato de cirurgias contaminadas apresentarem carga microbiana mais alta no local da cirurgia, apesar de não haver infecção. A elevada carga microbiana também pode aumentar a possibilidade de contaminação durante o procedimento, além de aumentar as taxas de ISCs (Mangram *et al.*, 1999). Assim, dois cães do G2 (20%) desenvolveram ISC dentro de 30 dias após a intervenção, causadas por infecção mista envolvendo *S. pseudintermedius*. Esses isolados são semelhantes aos obtidos da pele dos animais durante o período intraoperatório (Figura 6A). Estudos anteriores realizados em ambientes veterinários já relataram a relação genética entre isolados bacterianos de cães, pessoas e ambiente hospitalar, identificando tal achado como fator de risco para aquisição de infecções associadas à saúde (Feßler *et al.* 2018; Perkins *et al.*, 2020).

Curiosamente, alta ocorrência de isolados de *Staphylococcus* sp. neste estudo apresentou os genes *blaZ* (79,17%), *mecA* (43,75%), *tet(M)* (41,67%) e *aacA-aphD* (25%), conferindo resistência a penicilinas, beta-lactâmicos, tetraciclina e aminoglicosídeos, respectivamente. Esses resultados concordam com estudos anteriores sobre resistência fenotípica publicados pelo grupo dos autores (Menezes *et al.*, 2022). Taxas altas de resistência à penicilina (80-100%), oxacilina (50%), cefoxitina (53,33-75,86%), tetraciclina (65-73,33%), gentamicina (34,48-66,67%) e eritromicina (73,33-75,86%) em testes de difusão em disco foram observadas (Menezes *et al.*, 2022). No entanto, apesar das altas taxas de resistência fenotípica à eritromicina encontradas, nenhum dos isolados foi positivo para o gene *ermA* no presente estudo. A diferença entre a resistência à eritromicina fenotípica e genotípica pode ser atribuída à presença de outros genes não analisados neste estudo, como *ermB* e *ermC* (Rasool *et al.*, 2022). Esse achado destaca a necessidade de investigações adicionais sobre o mecanismo de resistência desses isolados (Rasool *et al.*, 2022). Taxas de resistência semelhantes foram recentemente relatadas por Teixeira *et al.* (2023), em relação à resistência a aminoglicosídeos (84%), penicilina (76%), tetraciclina (53,3%) e oxacilina (24%) na região sudeste do Brasil.

Isolados de *Staphylococcus* spp. que carregam o gene *mecA* são geralmente multirresistentes, pois esse gene confere resistência a todos antibióticos da classe dos β -lactâmicos, com exceção das cefalosporinas de quinta geração, e também relaciona-se com resistência a outras classes de antimicrobianos (WHO, 2019b). Esse

comportamento restringe as opções de tratamento e compromete os resultados dos pacientes humanos e outros animais. Além disso, tetraciclina, gentamicina e eritromicina podem ser opções alternativas para tratar infecções causadas por MRS, evitando o uso de antibióticos com alta toxicidade, como rifampicina ou cloranfenicol, ou antimicrobianos considerados criticamente importantes na medicina humana, como vancomicina, linezolida e fluoroquinolonas (Ma *et al.*, 2020). Portanto, as altas taxas dos genes *tet(M)* e *aacA-aphD*, além de *blaZ* e *mecA*, detectadas em nosso estudo, são preocupantes.

Essas altas taxas de MRS detectados no estudo contrastam com a baixa frequência (<10%) de colonização por MRS relatada na prática clínica de animais de companhia, profissionais de saúde veterinária e ambientes veterinários em alguns países, como Áustria (Loncaric *et al.*, 2019), Bangladesh (Rana *et al.*, 2022), Alemanha (Feuer *et al.*, 2024), Tanzânia (Katakweba *et al.*, 2024) e Estados Unidos (Phophi *et al.*, 2023; Perkins *et al.*, 2020). No entanto, corroboram com a ocorrência moderada ou alta (>10%) observada no Brasil (Teixeira *et al.*, 2019; Menezes *et al.*, 2021; Menezes *et al.*, 2022; Viegas *et al.* 2022; Silva *et al.*, 2024), Irã (Naziri *et al.*, 2023), Itália (Menandro *et al.*, 2019), Nigéria (Moses *et al.*, 2022), Polônia (Miszczak *et al.*, 2023), Portugal (Araújo *et al.*, 2024), África do Sul (Prior *et al.*, 2022) e Suíça (Dazio *et al.*, 2021), com taxas de ocorrência variando de 10 a 85,9%.

Embora a patogenicidade de *S. epidermidis* em medicina humana seja bem estabelecida, a relevância desta bactéria na medicina veterinária ainda é possivelmente subestimada. No entanto, há crescente reconhecimento das espécies de CoNS, principalmente *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, como potenciais patógenos causadores de infecções adquiridas em ambientes veterinários (Viegas *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2024; Dazio *et al.*, 2021). O presente estudo mostrou maior frequência de resistência à meticilina em isolados de CoNS (50%) do que em *S. pseudintermedius* (37,50%), uma espécie de *Staphylococcus* spp. coagulase-positiva. Embora não tenha sido encontrada significância estatística, esse achado concorda com resultados fenotípicos publicados pelo mesmo grupo de autores (Menezes *et al.*, 2022) e por Adiguzel *et al.* (2022).

A alta frequência de isolados de *Staphylococcus* spp. portadores do gene *mecA* no presente estudo, assim como aqueles frequentemente relatados mundialmente nas

últimas duas décadas, destaca a emergência exponencial de MRS globalmente. Essa tendência é notável, mesmo em países que tradicionalmente apresentam baixa prevalência, evidenciando a necessidade urgente de esforços eficazes de vigilância para elaborar estratégias que mitiguem essa ameaça (Papić *et al.*, 2021). Portanto, é imperativo dar atenção às políticas de controle de infecção para enfrentar a propagação de bactérias resistentes e minimizar o impacto na saúde animal.

Enterococcus spp. são patógenos oportunistas capazes de sobreviver por meses no ambiente sob condições adversas. Podem causar infecções adquiridas em ambiente hospitalar, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Ramos *et al.*, 2020). Embora menos prevalentes em comparação com *Staphylococcus spp.* no desencadeamento de infecções em cães, a incidência de infecções por *Enterococcus spp.* tem aumentado, com isolados multirresistentes representando preocupação significativa tanto em ambientes críticos humanos quanto de cães (Torres *et al.*, 2018; Sacramento *et al.*, 2022). Apesar da menor prevalência, infecções causadas por espécies enterocócicas são difíceis de tratar devido aos diferentes mecanismos intrínsecos de resistência bacteriana e ao elevado nível de resistência adquirida, limitando as opções de tratamento (Ramos *et al.*, 2020; Raza *et al.*, 2018).

No presente estudo, *Enterococcus faecium* (89,47%) e *E. faecalis* (10,53%) foram mais frequentemente obtidos da pele de cães (52,63%) e do ambiente da sala operatória (31,58% [6/19]). Esses isolados apresentaram padrão de diversidade e similaridade diferente (Figura 7A) em comparação com *S. pseudintermedius* e CoNS, mostrando frequência de resistência (FR) menor do que as outras espécies. Curiosamente, oito isolados indistinguíveis por padrões de bandas PFGE foram observados em cinco procedimentos no G1 (key: 11, 16, 34, 60 e 65) e dois procedimentos no G2 (key: 66, 98 e 99), obtidos durante sete procedimentos diferentes, tanto da pele de cães (n=2) e cirurgias (n=2), quanto do ambiente (n=4). Todos, exceto um desses isolados, possuíam o gene *tet(M)*. Esse achado provavelmente indica a persistência de um isolado específico no ambiente cirúrgico e destaca a necessidade de procedimentos mais adequados de limpeza e desinfecção adaptados a essa espécie. Chung *et al.* (2014) relataram possível agrupamento clonal de *Enterococcus spp.* resistentes a antibióticos isolados de cães e profissionais de saúde em hospital veterinário na Coreia. Além disso, Ghosh *et al.* (2011)

documentaram baixa FR de *E. faecium* nas fezes de cães em UTI, juntamente com isolados geneticamente relacionadas entre cães, humanos e surtos hospitalares.

Alta taxa de isolados enterococócicos apresentaram o gene de resistência à tetraciclina (78,95%), achado similar à resistência fenotípica relatada (78,95%) pelo mesmo grupo de pesquisa para os mesmos isolados (Menezes *et al.*, 2022) e por outros autores (Darwich *et al.*, 2021; Oguttu *et al.*, 2021; Stępień-Pyśniak *et al.*, 2021; Moon *et al.*, 2023). No entanto, a frequência de detecção de *blaZ* (10,53%) e *ermA* (0%) contrasta com os resultados fenotípicos de resistência à penicilina (68,42%) e eritromicina (84,24%) para esses isolados específicos (Menezes *et al.*, 2022), e com os dados relatados por outros autores (Darwich *et al.*, 2021). Vários estudos têm relatado a ausência de uma forte associação entre a resistência fenotípica e genotípica à eritromicina, o que destaca a necessidade de investigações moleculares mais abrangentes para essas espécies (Stępień-Pyśniak *et al.*, 2021).

E. coli foi isolado de dois cães submetidos a dois procedimentos diferentes. Em um desses procedimentos, os isolados foram obtidos tanto do local cirúrgico (*key*: 147) quanto do ambiente (*key*: 121, 122 e 123), exibindo alta similaridade nos padrões de bandas de PFGE. Além disso, todos isolados foram negativos para os genes de resistência investigados, apesar de classificados fenotipicamente como multirresistentes. Como a bactéria Gram-negativa mais frequentemente identificada em animais, *E. coli* é responsável por ampla gama de doenças, incluindo síndromes sépticas, distúrbios gastrointestinais, enterotoxemia e ISCs (Arbab *et al.*, 2022). Cirurgias contaminadas têm carga microbiana mais alta no tecido e/ou inflamação crônica, tornando esses locais mais susceptíveis à contaminação por bactérias ambientais (Mangram *et al.*, 1999; Verwilghen e Singh, 2015). Assim, era esperado que essa espécie bacteriana fosse isolada apenas em G2. Apesar das altas taxas de resistência fenotípica observada nos isolado de *E. coli*, com 87,50% classificada como MDR (Magiorakos *et al.*, 2012), nenhum dos genes de resistência pesquisado foram detectados, indicando a necessidade de investigação genômica mais ampla para essa espécie.

Os resultados deste estudo ressaltam a importância da vigilância contínua e evidenciam a necessidade de pesquisas mais abrangentes, tanto transversais quanto longitudinais, para uma compreensão mais profunda da dinâmica de transmissão dos

genes de resistência e suas implicações clínicas. As elevadas taxas de *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. portando genes de resistência relevantes nesse ambiente hospitalar servem como um alerta para outras clínicas e hospitais veterinários no Brasil. Estudos adicionais seriam fundamentais para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle de infecção e para o aprimoramento das práticas de manejo antimicrobiano na medicina veterinária.

A limitação no número de isolados de *E. coli* neste estudo dificulta a realização de uma análise confiável da frequência de genes que conferem resistência aos antimicrobianos nessa espécie. Além disso, investigação mais ampla incluindo outros genes de resistência, como gene *ermB* e *ermC*, contribuiria para compreensão dos mecanismos de resistência à eritromicina em *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. Apesar dessas limitações, o estudo fornece valiosas informações sobre epidemiologia da resistência bacteriana em ambiente de saúde veterinário.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo revelou altas taxas de *Staphylococcus* spp. resistente à meticilina e *Enterococcus* spp. resistentes à tetraciclina colonizando o ambiente em hospital veterinário de ensino no Brasil. A análise por PFGE indicou grande diversidade de espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa entre cães, veterinários e a sala de cirurgia. Além disso, foram identificados isolados geneticamente relacionados de *Enterococcus* spp. provenientes de diferentes fontes e procedimentos, evidenciando falhas nos protocolos de limpeza e desinfecção no ambiente estudado. Esse achado reforça a necessidade de políticas eficazes de controle de infecção para reduzir a disseminação de bactérias resistentes. Ambientes hospitalares e cães podem atuar como reservatórios de bactérias multirresistentes. O fortalecimento da conscientização e do monitoramento desses organismos, incluindo vigilância contínua da multirresistência bacteriana, em ambientes veterinários, é essencial para a prevenção e o controle de infecções.

9 REFERÊNCIAS

Adiguzel MC, Schaefer K, Rodriguez T, Ortiz J, Sahin O (2022) Prevalence, Mechanism, Genetic Diversity, and Cross-Resistance Patterns of Methicillin-Resistant *Staphylococcus* Isolated from Companion Animal Clinical Samples

Submitted to a Veterinary Diagnostic Laboratory in the Midwestern United States. **Antibiotics** 11:609.

Akbar A, Anal, AK (2011) Food safety concerns and food-borne pathogens, *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Campylobacter*. **FUUAST journal of Biology** 1:5–17.

Antimicrobial Resistance Collaborators (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet** 12;399(10325):629-655.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017) **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde no 17: Avaliação dos indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e resistência microbiana do ano de 2017**. Disponível em: <https://bit.ly/2Is5KPf>. Acessado em: 11/12/2024.

Arais LR, Barbosa AV, Carvalho CA, Cerqueira AMF (2016) Antimicrobial resistance, integron carriage, and *gyrA* and *gyrB* mutations in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dogs with otitis externa and pyoderma in Brazil. **Veterinary Dermatology** 27:113-e31.

Araújo D, Oliveira R, Silva BL, Castro J, Ramos C, Matos F, Almeida C, Silva S. Antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus* spp. isolated from clinical specimens of companion animals in Northern Portugal, 2021–2023. **The Veterinary Journal** 305:106153.

Arbab S, Ullah H, Wang W, Zhang J (2022) Antimicrobial drug resistance against *Escherichia coli* and its harmful effect on animal health. **Veterinary Medicine and Science**. 8:1780-1786.

Bag S, Saha B, *et al.* (2016) An Improved Method for High Quality Metagenomics DNA Extraction from Human and Environmental Samples. **Scientific Reports** 2016;6:26775.

Bauer A, Kirby WMN, Sherris JC, Turk M (1996) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **The American Journal of Pathology** 45:493–496.

Braga IA, Campos PA, Gontijo-Filho PP, Ribas RM (2018) Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. **The Journal of hospital infection** 99:318–324

Brusselaers N, Vogelaers D, Blot S (2011) The rising problem of antimicrobial resistance in the intensive care unit. **Annals of Intensive Care** 1:1-7.

Burdett V (1996) *Tet(M)*-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent. **Journal of bacteriology** 178:3246–3251.

Canene-Adams K (2013) Chapter Twenty Four - General PCR. **Methods in Enzymology** 529:291-298.

Chaudhary R, Thapa SK, Rana JC, Shah PK (2017) Surgical Site Infections and Antimicrobial Resistance Pattern. **Journal of Nepal Health Research Council** 15:120–123.

China B, Pirson V, Mainil J (1996) Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Applied Environmental Microbiology** 62:3462–3465.

Chung YS, Kwon KH, Shin S, Kim JH, Park YH, Yoon JW (2014) Characterization of Veterinary Hospital-Associated Isolates of *Enterococcus* Species in Korea. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 24:386–393.

CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute (2018) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, CLSI Document M02-A10. Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute, p. 240.

Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 65:490–495.

Darwich L, Seminati C, Burballa A, Nieto A, Durán I, Tarradas N, Molina-López RA (2021) Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from urinary tract infections in companion animals in Spain. **Veterinary Record** 188:e60.

Dazio V, Nigg A, *et al.* (2021) Acquisition and carriage of multidrug-resistant organisms in dogs and cats presented to small animal practices and clinics in Switzerland. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 35:970–979.

Duim B, Verstappen KM, Broens EM, Laarhoven LM, van Duijkeren E, Hordijk J, de Heus P, Spaninks M, Timmerman AJ, Wagenaar JA (2015) Changes in the Population of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and

Dissemination of Antimicrobial-Resistant Phenotypes in the Netherlands. **Journal of Clinical Microbiology** 54:283-288.

Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C (2012) Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. **Indian Journal of Medical Research** 135:389–396.

Dutescu IA (2021) The Antimicrobial Resistance Crisis: How Neoliberalism Helps Microbes Dodge Our Drugs. **International Journal of Health Services** 51:521-530.

Essack SY, Hall LMC, Pillay DG, McFadyen ML, Livermore DM (2001) Complexity and Diversity of *Klebsiella pneumoniae* Strains with Extended-Spectrum β -Lactamases Isolated in 1994 and 1996 at a Teaching Hospital in Durban, South Africa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 45:88–95.

Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, Lopes R, Otutumi LK, Gonçalves DD, Dropa M, Matté MH, Monte DF, Landgraf M, Francisco GR, Bueno MF, de Oliveira Garcia D, Knöbl T, Moreno AM, Lincopan N (2016) Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. **Euro surveillance** 21:1-6.

Feuer L, Frenzer SK, Merle R, Bäumer W, Lübke-Becker A, Klein B, Bartel A (2024) Comparative Analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Prevalence and Resistance Patterns in Canine and Feline Clinical Samples: Insights from a Three-Year Study in Germany. **Antibiotics** 13:660.

Feßler AT, Schuenemann R, Kadlec K, Hensel V, Brombach J, Murugaiyan J, Oechtering G, Burgener IA, Schwarz s (2018) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) among employees and in the environment of a small animal hospital. **Veterinary Microbiology** 221:153–158.

Foschi D, Yakushkina A, Cammarata F, Lamperti G, Colombo F, Rimoldi S, Antinori S, Sampietro GM (2022) Surgical site infections caused by multi-drug resistant organisms: a case–control study in general surgery. *Updates in Surgery* 74:1763–1771.

Founou RC, Blocker AJ, Noubom M, Tsayem C, Choukem SP, Dongen MV, Founou LL (2021) The COVID-19 Pandemic: a Threat to Antimicrobial Resistance Containment. *Future Science OA* 7:FSO736.

Franke AE, Clewell DB (1980) Evidence for conjugal transfer of a *Streptococcus*

faecalis transposon (Tn916) from a chromosomal site in the absence of plasmid DNA. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology** 46:7780.

Freiwald A, Sauer S (2009) Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature Protocols** 4:732–742.

Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, Lamm W, Clark C, MacFarquhar J, Walton AL, Reller LB, Sexton DJ (2002) Health care--associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. **Annals of internal medicine** 137:791-797.

Félix B, Roussel S, Pot B (2015) Harmonization of PFGE profile analysis by using bioinformatics tools: example of the *Listeria monocytogenes* European Union Reference Laboratory network. **Methods in molecular biology** 1301:9-28.

Gheller BG, Meirelles ACF, Figueira PT, Holsbach V (2017) Patógenos bacterianos encontrados em cães com otite externa e seus perfis de suscetibilidade a diversos antimicrobianos. **Pubvet** 11:159–167.

Ghosh A, Dowd SE, Zurek L (2011) Dogs Leaving the ICU Carry a Very Large Multi-Drug Resistant Enterococcal Population with Capacity for Biofilm Formation and Horizontal Gene Transfer. **PLoS One** 6:e22451.

Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT (2010) Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova** 33:667-679.

Hanczvikkel A, Tóth Á (2018). Quantitative study about the role of environmental conditions in the survival capability of multidrug-resistant bacteria. **Journal of infection and public health** 11:801–806.

Hollenbeck BL, Rice LB (2012) Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. **Virulence** 3:421–433.

Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Guerin PJ, Piddock LJ (2016) Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **Lancet** 387:176–187.

Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L, Wrigley D, Barrett T, Ribot E (2005) Establishment of a Universal Size Standard Strain for Use with the PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Protocols: Converting the National Databases to the New Size Standard. **Journal of Clinical Microbiology** 43:1045–1050.

Jin M, Osman M, Green BA, Yang Y, Ahuja A, Lu Z, Cazer LC (2023) Evidence for the transmission of antimicrobial resistant bacteria between humans and companion animals: A scoping review. **One Health** 17:100593.

Katakweba AAS, Iversen CM, Tsaxra JB, Muhairwa AP, Moodley A, Olsen JE (2024) Brief communication: Carrier rate, antimicrobial resistance and molecular typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs from Morogoro, Tanzania. **Veterinary Dermatology** 35:557-562.

Keskimäki M, Eklund M, Pesonen H, Heiskanen T, Siitonen A (2001) EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 40:151–156.

Kojima A, Ishii Y, Ishihara K, Esaki H, Asai T, Oda C, Tamura Y, Takahashi T, Yamaguchi K (2005) Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Farm Animals from 1999 to 2002: Report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 49:3533–3537.

Kumar R, Yadav BR, Singh RS (2010) Genetic Determinants of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Mastitic Crossbred Cattle. **Current Microbiology** 60:379–386.

Laudy AE, Róg P, Smolińska-Król K, Ćmiel M, Słoczyńska A, Patzer J, Dzierżanowska D, Wolinowska R, Starościak B, Tyski S (2017) Prevalence of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Warsaw, Poland, detected by various phenotypic and genotypic methods. **PLoS One** 12:e0180121.

Logan LK, Weinstein RA (2017) The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. **The Journal of Infectious Diseases** 215:S28-S36.

Loncaric I, Tichy A, Handler S, Szostak M, Tickert M, Diab-Elschahawi M, Spergser J, Künzel F (2019) Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus* sp. (MRS) in Different Companion Animals and Determination of Risk Factors for Colonization with MRS. **Antibiotics** 8:36.

- Lopez-Canovas L, Martinez Benitez MB, Herrera Isidron JA, Flores Soto E. Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future (2019) **Analytical biochemistry** 573:17-29.
- Lozano C, Rezusta A, Ferrer I, Pérez-Laguna V, Zarazaga M, Ruiz-Ripa L, Revillo MJ, Torres C (2017) *Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases** 17:268–270.
- Ma GC, Worthing KA, Gottlieb T, Ward MP, Norris JM (2020) Molecular characterization of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pet dogs. **Zoonoses Public Health** 67:222–230.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection** 18(3):268-281.
- Mandell GL (1975) Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. *In vitro* and *in vivo* studies with emphasis on staphylococcal--leukocyte interaction. **The Journal of clinical investigation** 55:561–566.
- Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR (1999). Guideline for Prevention of Surgical Site Infection, 1999. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. **American Journal of Infection Control** 27:97–132.
- Marra AR, Fernando L, Camargo A, Carlos A, Pignatari C, Sukiennik T, Behar PRP, Medeiros EAS, Ribeiro J, Girão E, *et al.* (2011) Nosocomial bloodstream infections in brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology** 49:1866–1871.
- Mayhew D, Mendonca V, Murthy BVS (2019) A review of ASA physical status – historical perspectives and modern developments. **Anaesthesia** 74:373-9.
- McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC (2003) Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. **Journal of Clinical Microbiology** 41:5113-20.

McEwen SA, Collignon PJ (2018) Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **Microbiology Spectrum** 6:1-26.

Mehrotra M, Wang G, Johnson WM (2000) Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. **Journal of Clinical Microbiology** 38:1032–1035.

Menandro ML, Dotto G, Mondin A, Martini M, Ceglie L, Pasotto D (2019) Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from symptomatic companion animals in Northern Italy: Clonal diversity and novel sequence types. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 66:101331.

Menezes MP, Borzi MM, Ruaro MA, Cardozo MV, Rabelo RC, Verbisck NV, Moraes PC (2022) Multidrug-Resistant Bacteria Isolated From Surgical Site of Dogs, Surgeon's Hands and Operating Room in a Veterinary Teaching Hospital in Brazil. **Topics in Companion Animal Medicine** 49:100638.

Menezes MP, Facin AC, Cardozo MV, Costa MT, Moraes PC (2021) Evaluation of the Resistance Profile of Bacteria Obtained From Infected Sites of Dogs in a Veterinary Teaching Hospital in Brazil: A Retrospective Study. **Topics in Companion Animal Medicine** 42:100489.

Mikłasińska-Majdanik M (2021) Mechanisms of Resistance to Macrolide Antibiotics among *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics (Basel)** 10:1406.

Miszczak M, Korzeniowska-Kowal A, Wzorek A, Gamian A, Rypuła K, Bierowiec K (2023) Colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus* species in healthy and sick pets: prevalence and risk factors. **BMC Veterinary Research** 19:85.

Moon B-Y, Ali MdS, Choi J-H, Heo Y-E, Lee Y-H, Kang H-S, Kim T-S, Yoon SS, Moon D-C, Lim S-K (2023) Antimicrobial Resistance Profiles of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Isolated from Healthy Dogs and Cats in South Korea. **Microorganisms** 11:2991.

Moraes BA, Cravo CAN, Loureiro MM, Solari CA, Asensi MD (2000) Epidemiological analysis of bacterial strains involved in hospital infection in a University Hospital from Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 42:201–207.

Moraes Figuerêdo Duarte Moraes M, de Souza Pollo A, Lux Hoppe EG (2022) Filarids (Spirurida: Onchocercidae) in wild carnivores and domestic dogs from the Brazilian Atlantic forest. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 16:e0010213.

Moses IB, Esimone CO, Iroha IR, Rubin JE, Sniatynsky MK, Ribeiro AC da S, Santos FF, Silva RC, Gales AC (2022) Antibiotypes and high frequency of toxin genes in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from nares of dogs and dog guardians in Nigeria. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. 89:101870.

Moses IB, Santos FF, Gales AC (2023). Human Colonization and Infection by *Staphylococcus pseudintermedius*: An Emerging and Underestimated Zoonotic Pathogen. **Microorganisms** 11:581.

Naziri Z, Majlesi M (2023) Comparison of the prevalence, antibiotic resistance patterns, and biofilm formation ability of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs and dogs with skin infections. **Veterinary Research Communications** 47:713–721.

Neoh HM, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives (2019) **Infection, Genetics and Evolution** 74:103935.

Nusbaum NJ. The polymerase chain reaction and rapid antibiotic resistance screening (1990) **Journal of Infectious Disease**. 1990 162:1002.

Oguttu JW, Qekwana DN, Odoi A (2021) Prevalence and Predictors of Antimicrobial Resistance Among *Enterococcus* spp. From Dogs Presented at a Veterinary Teaching Hospital, South Africa. **Frontiers in Veterinary Science** 7:589439.

Papić B, Golob M, Zdovc I, Kušar D, Avberšek J (2021) Genomic insights into the emergence and spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary clinics. **Veterinary Microbiology** 258:109119.

Perkins A V, Sellon DC, Gay JM, Lofgren ET, Moore DA, Jones LP, Davis MA (2020) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* on hand-contact and animal-contact surfaces in companion animal community hospitals. **The Canadian Veterinary Journal** 61:613–620.

Phophi L, Abouelkhair M, Jones R, Henton M, Qekwana DN, Kania SA (2023) The molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Staphylococcus*

pseudintermedius canine clinical isolates submitted to a veterinary diagnostic laboratory in South Africa. **PLoS One** 18:e0290645.

Pimenta LKL, Rodrigues CA, Filho ARG, Coelho CJ, Goes V, Estrela M, de Souza P, Avelino MAG, Vieira JDG, Carneiro L (2023) *Staphylococcus* spp. Causatives of Infections and Carrier of *blaZ*, *femA*, and *mecA* Genes Associated with Resistance. **Antibiotics (Basel)** 12:671.

Pillonetto M, Jordão RTS, Andraus GS, Bergamo R, Rocha FB, Onishi MC, de Almeida BMM, Nogueira KDS, Dal Lin A, Dias VMCH, de Abreu AL (2021) The Experience of Implementing a National Antimicrobial Resistance Surveillance System in Brazil. **Frontiers in Public Health** 8:575536.

Pires dos Santos T, Damborg P, Moodley A, Guardabassi L. Systematic Review on Global Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: Inference of Population Structure from Multilocus Sequence Typing Data. **Frontiers in Microbiology** 7:1599.

Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P (2011) Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 70:119–123.

Prior CD, Moodley A, Karama M, Malahlela MN, Leisewitz A (2022) Prevalence of methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs with skin and ear infections in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association** 93:40a–40h.

Ramos S, Silva V, Dapkevicius M, Igrejas G, Poeta P (2020) Enterococci, from Harmless Bacteria to a Pathogen. **Microorganisms** 8:1118.

Rana EA, Islam MZ, Das T, Dutta A, Ahad A, Biswas PK, Barua H (2022) Prevalence of coagulase-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs in Bangladesh. **Veterinary Medicine and Science** 8:498–508.

Rasool Z, Noreen H, *et al.* (2022) Genotypic and Phenotypic Characterization of Erythromycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis and Humans in Close Contact. **Tropical Medicine and Infectious Disease** 8:26.

Raza T, Ullah SR, Mehmood K, Andleeb S (2018) Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. **The Journal of the Pakistan Medical Association** 68:768–772.

Rebelo AR, Bortolaia V, *et al.* (2018) Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. **Euro surveillance** 23:17-00672.

Ribot EM, Fair MA, Gautam R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ (2006) Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease** 3:59–67.

Rice LB (2008) Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **The Journal of Infectious Diseases** 197:1079–1081.

Rodrigues AC, Belas A, Marques C, Cruz L, Gama LT, Pomba C (2018) Risk Factors for Nasal Colonization by Methicillin-Resistant Staphylococci in Healthy Humans in Professional Daily Contact with Companion Animals in Portugal. **Microbial Drug Resistance** 24:434–446.

Rolo J, Worning P, Boye Nielsen J, Sobral R, Bowden R, Bouchami O, Damborg P, Guardabassi L, Perreten V, Westh H, Tomasz A, de Lencastre H, Miragaia M (2017) Evidence for the evolutionary steps leading to *mecA*-mediated β -lactam resistance in staphylococci. **PLoS Genetics** 13:e1006674.

Sacramento AG, D. Andrade AC, Teotonio BN, de Oliveira Santos LM, da Silva LCBA, Lincopan N, Sellera FP (2022) WHO critical priority van-type vancomycin-resistant *Enterococcus* in dogs and cats. **Preventive Veterinary Medicine** 202:105614.

Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN (2001) Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the sentry antimicrobial surveillance program. **The Brazilian journal of infectious diseases** 5:200–214.

Salgado-Caxito M, Benavides JA, Munita JM, Rivas L, García P, Listoni FJP, Moreno-Switt AI, Paes AC (2021a) Risk factors associated with faecal carriage of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* among dogs in Southeast Brazil. **Preventive Veterinary Medicine** 190:105316.

Salgado-Caxito M, Moreno-Switt AI, Paes AC, Shiva C, Munita JM, Rivas L, Benavides JA (2021b) Higher prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant enterobacterales in dogs attended for enteric viruses in Brazil before and after treatment with cephalosporins. **Antibiotics** 10:1–13.

Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, Geider K (2008) Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis. **PLoS One** 3:e2843.

Schwartz DC, Cantor CR (1984) Separation of Yeast Chromosome-Sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. **Cell** 37:67-75.

Schwarz S, Enne VI, Duijkeren E (2016) 40 years of veterinary papers in JAC – what have we learnt? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 71:2681-2690.

Shoen HRC, Rose SJ, Ramsey SA, Morais H, Bermudez, LE (2019) Analysis of *Staphylococcus* infections in a veterinary teaching hospital from 2012 to 2015. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 66:101332.

Silva BA, do Amarante VS, Xavier RGC, Colombo SA, da Silva TF, Brenig B, Aburjaile FF, Azevedo VAC, Silva ROS (2024) Characterization of ESBL/AmpC-producing extraintestinal *Escherichia coli* (ExPEC) in dogs treated at a veterinary hospital in Brazil. **Research in Veterinary Science** 166:105106.

Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, Amicosante G, Toniolo A, Fadda G, Italy ESBL Study Group (2002) Occurrence of Extended-Spectrum β -Lactamases in Members of the Family *Enterobacteriaceae* in Italy: Implications for Resistance to β -Lactams and Other Antimicrobial Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 46:196–202.

Stępień-Pyśniak D, Bertelloni F, Dec M, Cagnoli G, Pietras-Ożga D, Urban-Chmiel R, Ebani VV (2021) Characterization and Comparison of *Enterococcus* spp. Isolates from Feces of Healthy Dogs and Urine of Dogs with UTIs. **Animals** 11:2845.

Suthar N, Roy S, Call DR, Besser TE, Davis MA (2014) An individual-based model of transmission of resistant bacteria in a veterinary teaching hospital. **PLoS One** 9:e98589.

Tang KWK, Millar BC and Moore JE (2023) Antimicrobial Resistance (AMR). **British Journal of Biomedical Science** 80:11387.

Teixeira IM, de Oliveira Ferreira E, de Araújo Penna B (2019) Dogs as reservoir of methicillin resistant coagulase negative staphylococci strains – A possible neglected risk. **Microbiology Pathogenesis** 135:103616.

Teixeira IM, Moraes Assumpção Y, *et al.* (2023) Investigation of antimicrobial susceptibility and genetic diversity among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs in Rio de Janeiro. **Scientific Reports** 13:20219.

The Center for Disease Dynamics Economics and Policy (2019) **ResistanceMap – antibiotic use**. Disponível em: <https://resistancemap.onehealthtrust.org/>. Acessado em: 20/12/2024.

Torres C, Alonso CA, Ruiz-Ripa L, León-Sampedro R, Del Campo R, Coque TM (2018) Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. **Microbiology Spectrum** 6: RBA-0032-2018.

Tsuchida S, Umemura H, Nakayama T (2020) Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. **Molecules** 25:4775.

Turk R, Singh A, Weese JS (2015) Prospective Surgical Site Infection Surveillance in Dogs. **Veterinary Surgery** 44:2–8.

Udou T (2001) Functional characterization of a multiple-antibiotic resistant plasmid from clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases** 75:382-389.

Ventola CL (2015) The antibiotic resistance crisis part 1: causes and threats. **Pharmacy and therapeutics** 40:277-283.

Verwilghen D, Singh A (2015) Fighting Surgical Site Infections in Small Animals. Are We Getting Anywhere? **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice** 45:243–276.

Viegas FM, Santana JA, *et al.* (2022) Occurrence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. in diseased dogs in Brazil. **PLoS One** 17:e0269422.

Walther B, Tedin K, Lübke-Becker A (2017) Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. **Veterinary Microbiology** 200:71–78.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION (2015) **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**. Geneva, 28p. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf?sequence=1. Acessado em: 11/12/2024.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019a) **2019 Antibacterial Agents In Clinical Development: An analysis of the antibacterial clinical development pipeline**. Geneva, 35 p. Disponível em:

<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/330420/9789240000193-eng.pdf>.

Acessado em: 11/12/2024.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019b) **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine, 6th Revision**. Geneva, 52 p. Disponível em:

<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?sequence=1>. Acessado em: 04/12/2024.

Zarpellon MN, Viana GF, Mitsugui CS, Costa BB, Tamura NK, Aoki EE, Helbel C, Nishiyama SAB, Saalfeld SMS, Tognim MCB (2018) Epidemiologic surveillance of multidrug-resistant bacteria in a teaching hospital: a 3-year experience. **American Journal of Infection Control** 46:387–392.

APÊNDICES

Apêndice 1. Classificação da ferida cirúrgica. Fonte: Guia de uso racional de antimicrobianos para cães e gatos (MAPA, 2022).

CLASSIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO	EXEMPLOS DE PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS
CIRURGIAS LIMPAS (2-4,8%)	- Eletivas; não-emergenciais; não traumática; - Sem inflamação aguda; não infectada; - Sem quebra da técnica asséptica; - Fechamento primário; sem aplicação de dreno; - Sem penetração do trato respiratório, gastrointestinal e geniturinário (com exceção de procedimentos de esterilização cirúrgica).	- Laparotomia exploratória, Esplenectomia (não oncológica); - Excisão de nódulos cutâneos sem inflamação aguda; - Ovário-salpingo histerectomia/orquiectomia; - Oncológica não contaminada/infectada (ex.: lipoma); - Artrotomias (osteocondrite dissecante, excisão artroplástica da cabeça e colo femoral não traumática); - Cardiovasculares (persistência do ducto arterioso, persistência do arco aórtico direito); - Cirurgias da coluna não traumáticas (laminectomias); - Hérnias não encarceradas (umbilical, inguinal ou perineal), entre outros. - Cistostomia, colecistectomia, colecistoduodenostomia, enterotomia, cistotomia, gastrotomia, nefrectomia, enterectomia, cistectomia e gastrectomia sem tecido desvitalizado; - Oncológica com processo inflamatório agudo e não contaminada; - Osteossíntese de fraturas fechadas; - Ruptura diafragmática, entre outros. - Cirurgias da coluna traumáticas (estabilização);
CIRURGIAS LIMPAS-CONTAMINADAS (3,5-5%)	- Penetração sob condições controladas de trato respiratório, gastrointestinal e geniturinário com derramamento mínimo de líquido e sem evidência de urina, bile ou secreções infectadas; - Traumas não penetrantes/sem lesão de órgãos ocos; - Aplicação de dreno; - Presença de inflamação aguda; - Mínima quebra da técnica asséptica; - Procedimentos emergenciais que são considerados limpos.	- Colecistoduodenostomia, enterectomia, cistectomia e gastrectomia com tecido desvitalizado ou transgressão grave das técnicas assépticas e/ou derramamento de conteúdo (bile, urina e fezes); - Peritonite (<4h); - Piometra sem extravasamento ou com extravasamento de secreção recente (<4h); - Osteossíntese de fraturas abertas tipo II e III sem secreção purulenta e <4h de trauma; - Abscesso hepático não rompido; - Oncológica com ulceração e sem secreção purulenta; - Amputação por gangrena seca, entre outros.
CIRURGIAS CONTAMINADAS (4,6-12%)	- Penetração do trato respiratório, gastrointestinal e geniturinário com derramamento considerável de líquido e/ou evidência de urina, bile ou secreções infectadas; - Feridas abertas crônicas para reconstrução (p. ex. enxerto); - Feridas traumáticas penetrantes recentes (<4h); - Perfuração de trato respiratório, gastrointestinal e geniturinário com derramamento de líquido (<4h); - Incisão de sítio com inflamação aguda e não purulenta; - Máxima quebra da técnica asséptica.	- Peritonite séptica (>4h); - Piometra rompida com extravasamento de secreção tardia (>4h); - Ruptura intestinal ou de vesícula biliar, causada por colecistite necrotizante ou trauma (>4h); - Feridas abertas (>4h); - Oncológica infectada com secreção purulenta; - Amputação por gangrena úmida, entre outros.
CIRURGIAS INFECTADAS/SUJAS (6,7-18%)	- Perfuração pré-existente de trato gastrointestinal, geniturinário e respiratório (>4h); - Feridas traumáticas antigas (>4h); - Inflamação aguda com secreção purulenta; - Feridas com tecido desvitalizado (ex.: necrose) ou contaminação fecal.	